



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

GABRIEL DE ALMEIDA MAGALHÃES DIAS

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE FAMÍLIAS GÊNICAS TRANSPORTADORAS
DE MEMBRANA E DINÂMICA DE CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS EM
CENOSTIGMA PYRAMIDALE SOB ESTRESSE SALINO**

Recife

2025

GABRIEL DE ALMEIDA MAGALHÃES DIAS

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE FAMÍLIAS GÊNICAS TRANSPORTADORAS
DE MEMBRANA E DINÂMICA DE CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS EM
CENOSTIGMA PYRAMIDALE SOB ESTRESSE SALINO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado
da Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Valesca Pandolfi

Coorientador: Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto

Recife

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Dias, Gabriel de Almeida Magalhães.

Análise transcricional de famílias gênicas transportadoras de membrana e dinâmica de carboidratos não estruturais em *Cenostigma pyramidale* sob estresse salino / Gabriel de Almeida Magalhães Dias. - Recife, 2025.

42 p. : il., tab.

Orientador(a): Valesca Pandolfi

Coorientador(a): José Ribamar Costa Ferreira Neto

(Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, , 2025.

Inclui referências.

1. Genética . 2. Biologia molecular. 3. Bioinformática . 4. Fisiologia vegetal. 5. Estresse salino. 6. Expressão genica . I. Pandolfi, Valesca . (Orientação). II. Ferreira Neto, José Ribamar Costa. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

GABRIEL DE ALMEIDA MAGALHÃES DIAS

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE FAMÍLIAS GÊNICAS TRANSPORTADORAS
DE MEMBRANA E DINÂMICA DE CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIS EM
CENOSTIGMA PYRAMIDALE SOB ESTRESSE SALINO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado
da Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 12/03/2025

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Valesca Pandolfi (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Manassés Daniel da Silva (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Ms. Cleidiane Macêdo Santos (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

A catingueira (*Cenostigma pyramidale*), uma espécie da família Fabaceae, destaca-se como um excelente modelo para estudos sobre tolerância ao estresse salino, devido à sua capacidade de adaptação às condições adversas do semiárido brasileiro. A salinidade do solo compromete o crescimento vegetal, desencadeando mecanismos de resposta que envolvem transportadores de membrana, essenciais para a homeostase iônica, e carboidratos não estruturais (CNEs), fundamentais para a manutenção do balanço energético e osmótico da planta sob estresse. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar a resposta ao estresse salino em *C. pyramidale*, com ênfase na análise da expressão de quatro famílias gênicas de transportadores de membrana – Transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), Aquaporinas (AQPs), *Purine Permease* (PUP) e *P-type ATPase*, no transcriptoma radicular, e o acúmulo de carboidratos não estruturais (CNEs). As análises envolveram a mineração de transcritos no transcriptoma radicular da catingueira, identificação diferencial dos genes de interesse por análise *in silico*, correlação com QTLs de soja associados à tolerância ao estresse salino, validação da expressão via RT-qPCR e quantificação dos carboidratos não estruturais totais. A análise de similaridade gênica revelou 124 transcritos ortólogos a QTLs de soja relacionados à tolerância ao estresse salino. A expressão gênica via RT-qPCR demonstrou que quatro transcritos foram induzidos no tecido radicular após duas horas de estresse salino (NaCl 100 mM), enquanto cinco transcritos apresentaram indução após 11 dias, evidenciando o papel dos transportadores de membrana na resposta ao estresse. Além disso, a análise dos CNEs e amido revelou que, após 11 dias de exposição ao estresse salino, os níveis de amido diminuíram significativamente nas amostras submetidas ao estresse em comparação ao controle. Esse resultado sugere que o amido foi degradado para aumentar a concentração de carboidratos solúveis, desempenhando um papel crucial na osmorregulação e no fornecimento de energia, auxiliando a planta a minimizar os impactos da salinidade.

Palavras-chave: Catingueira; *ABC transporters*, Aquaporinas, *P-type ATPases*; *Purine Permease*.

ABSTRACT

The catingueira (*Cenostigma pyramidale*), a species of the Fabaceae family, stands out as an excellent model for studies on tolerance to saline stress, due to its ability to adapt to the adverse conditions of the Brazilian semiarid region. Soil salinity compromises plant growth, triggering response mechanisms that involve membrane transporters, essential for ionic homeostasis, and nonstructural carbohydrates (NSCs), fundamental for maintaining the energy and osmotic balance of the plant under stress. Therefore, this study aimed to evaluate the response to saline stress in *C. pyramidale*, with emphasis on the analysis of the expression of four gene families of membrane transporters - ABC transporters (ATP-binding cassette), Aquaporins (AQPs), Purine Permease (PUP) and P-type ATPase - in the root transcriptome, and the accumulation of nonstructural carbohydrates (NSCs). The analyses involved transcript mining in the catingueira root transcriptome, differential identification of genes of interest by in silico analysis, correlation with soybean QTLs associated with salt stress tolerance, validation of expression via RT-qPCR and quantification of total non-structural carbohydrates. Gene similarity analysis revealed 124 transcripts orthologous to soybean QTLs related to salt stress tolerance. Gene expression via RT-qPCR demonstrated that four transcripts were induced in root tissue after two hours of salt stress (100 mM NaCl), while five transcripts showed induction after 11 days, evidencing the role of membrane transporters in the stress response. Furthermore, analysis of CNEs and starch revealed that, after 11 days of exposure to salt stress, starch levels significantly decreased in samples subjected to stress compared to the control. This result suggests that starch was degraded to increase the concentration of soluble carbohydrates, playing a crucial role in osmoregulation and energy supply, helping the plant to minimize the impacts of salinity.

Keywords: Catingueira; *ABC transporters*, *Aquaporins*, *P-type ATPases*; *Purine Permease*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Número de transcritos expressos em cada família gênica: <i>ABC transporters</i> (ABC); Aquaporinas (AQPs); <i>Purine Permease</i> (PUP) e <i>P-type ATPase</i> , na Catngueira sob estresse salino.....	32
Figura 2 -	Número de transcritos constitutivos (TC), reprimidos e induzidos em cada uma das famílias gênicas <i>ABC transporters</i> -ABC (2A) e aquaporinas – AQPs (2B), em cada tratamento	33
Figura 3 -	Número de transcritos constitutivos, reprimidos ou induzidos para cada uma das famílias gênicas PUP e <i>P-type ATPase</i> , para cada tratamento aplicado. Perfil de expressão dos transcritos codificadores de <i>Purine Permease</i> (A) e <i>P-type ATPase</i> (B) para cada tratamento analisado	34
Figura 4 -	Apresentação do quantitativo das famílias gênicas de interesse de catingueira que apresentam ortologia com <i>loci</i> de soja ancorados, ou não, a regiões QTLs associados à tolerância a alta salinidade	38
Figura 5 -	Apresentação do quantitativo dos transcritos da família gênica de <i>ABC transporters</i> de catingueira que apresentam ortologia com <i>loci</i> de soja ancorados, ou não, a regiões QTLs associados à tolerância a alta salinidade	39
Figura 6 -	Apresentação do quantitativo dos transcritos da família gênica de Aquaporina de catingueira que apresentam ortologia com <i>loci</i> de soja ancorados, ou não, a regiões QTLs associados à tolerância a alta salinidade	39
Figura 7 -	Apresentação do quantitativo dos transcritos da família gênica de <i>Purine permease</i> de catingueira que apresentam ortologia com <i>loci</i> de soja ancorados, ou não, a regiões QTLs associados à tolerância a alta salinidade.....	40
Figura 8 -	Apresentação do quantitativo dos transcritos da família gênica de <i>P-type ATPase</i> de catingueira que apresentam ortologia com <i>loci</i> de soja ancorados, ou não, a regiões QTLs associados à tolerância a alta salinidade.....	40
Figura 9 -	Identificação nominal dos pares de ortólogos dos transcritos induzidos da Catingueira e soja ancorados nos QTLs de tolerância a salinidade	42

Figura 10 - Concentração de açúcares solúveis totais e amido nos tempos de estresse de 2 h e 11 dias.....	47
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição de termos de ontologia gênica (GO) para os transcritos diferencialmente expressos de <i>ABC transporters</i> (ABC), Aquaporinas (AQPs), <i>Purine Permease PUP</i> e <i>P-type ATPase</i>	35
Tabela 2 -	Sequência de <i>primers</i> dos genes de referência e alvos avaliados.....	45
Tabela 3 -	Expressão relativa e parâmetros de qPCR [eficiência de amplificação (E), declive (S), coeficiente de correlação (R) e interceptação Y] derivados de transcritos codificadores de sistemas de transportadores de membrana em <i>C. pyramidale</i> sob estresse de alta salinidade. * MT: modulação transcricional	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Transportadores ABC, <i>ABC trasnporters</i>
AQP	Aquaporinas
AST	Açúcares solúveis totais
BLAST	Ferramenta de alinhamento básico local; <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CDs	Sequência codificante; <i>Coding sequences</i>
CNEs	Carboidratos não estruturais
Ct11d	Controle de 11 dias
Ct30min	Controle de 30 minutos
GO	Ontologia gênica; <i>Gene ontology</i>
HAG2	Histona acetiltransferase tipo B
NBDs	Domínios de ligação a nucleotídeos; <i>Nucleotide binding</i>
NIPs	Proteínas análogas à nodulina; <i>Nodulin intrinsic proteins</i>
PIPs	Proteínas intrínsecas da membrana plasmática; <i>Plasma membrane intrinsic proteins</i>
PUP	Permease de purinas; <i>Purine Permease</i>
QTLs	Locus de Característica Quantitativa; <i>Quantitative Trait Locus</i>
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA; <i>RNA Sequencing</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real; <i>Real Time quantitative PCR</i>
SAC1	Supressor da actina-1; <i>Suppressor of actin (SAC) family of phosphoinositide phosphatases</i>
Salt11d	Salinidade: 11 dias
Salt2h	Salinidade: 2 horas
Salt30min	Salinidade: 30 minutos
SIPs	Proteínas intrínsecas básicas; <i>Small intrinsic protein</i>
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único; <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STMs	Sistema de transportadores de membranas
TIPs	Proteínas intrínsecas do tonoplasto; <i>Tonoplast intrinsic proteins</i>
TMDs	Domínios trasmembranares; <i>Transmembrane domain</i>
UR	Up-regulated

DR	Down-regulated
XIPs	Proteínas intrínsecas não caracterizadas; <i>X-intrinsic proteins</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1 Salinidade dos solos e consequências sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal	15
2.1.1 Consequências do estresse salino na fisiologia das plantas.....	16
2.2 Mecanismo de respostas das plantas ao estresse salino.....	17
2.2.1 Sistema de transportadores de membrana – STMs	18
2.2.1.1 Transportadores ABC (<i>ABC transporters</i>)	20
2.2.1.2 Aquaporinas (<i>AQPs</i>)	20
2.2.1.3 Permeases de Purinas (<i>Purine Permease, PUP</i>)	21
2.2.1.4 Atepasas do tipo P (<i>P-type ATPase</i>)	21
2.2.2 Carboidratos não estruturais (CNEs)	22
2.3 A catingueira como planta modelo de tolerância à salinidade.....	22
2.4 Bioinformática e análises moleculares em estudos de estresse salino em plantas	23
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 Análises <i>in silico</i>.....	27
4.1.1 Mineração de transportadores de membrana no transcriptoma da catingueira	27
4.1.2 Análise <i>in silico</i> da expressão diferencial.....	27
4.1.3 Anotação funcional dos transportadores de membrana diferencialmente expressos	28
4.1.4 Análise de similaridade e ortologia dos transportadores de membrana com QTLs	28
4.1.5 Seleção e desenho de <i>primers</i> para análise de expressão diferencial via RT-qPCR	29
4.2 Análises moleculares.....	29
4.2.1 Material vegetal e tratamentos	29
4.2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	30
4.2.3 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	30
4.3 Análise bioquímica de carboidratos não estruturais (açúcares solúveis) e amido	30
5 RESULTADOS	32
5.1 Identificação e expressão diferencial dos transportadores de membrana.....	32
5.2 Termos GO (<i>Gene Ontology</i>) dos transcritos diferencialmente expressos <i>in silico</i> ..	34

5.3 Análise de ortologia com QTLs de soja associados à tolerância a estresse salino	38
5.4 Transportadores de membrana induzidos (<i>up-regulated</i>).....	43
5.5 Determinação de CNEs e amido na catingueira após estresse salino	46
6 DISCUSSÃO	48
6.1 Transcritos diferencialmente expressos e termos GO associados	48
6.2 Ortólogos à QTLs de soja associados a tolerância a estresse salino	49
6.3 Expressão diferencial dos transportadores de membrana.....	50
6.4 Dinâmica de carboidratos não estruturais	51
7 CONCLUSÃO	53
8 BIBLIOGRAFIA.....	54

1 INTRODUÇÃO

A elevada concentração de sais nos solos, incluindo a região semiárida do Nordeste brasileiro, tem efeito sobre os processos fisiológicos, metabólicos e bioquímicos das plantas, promovendo desequilíbrio osmótico, seca fisiológica, estresse oxidativo e toxicidade iônica, resultando em restrições no crescimento e na produtividade vegetal (SHOUKAT *et al.*, 2019). Como resposta, as plantas desenvolveram diversos mecanismos de tolerância para prevenir ou minimizar os danos causados pelo estresse salino. Entre esses mecanismos, destaca-se a produção de proteínas essenciais para o metabolismo, na homeostase iônica e na manutenção do equilíbrio hídrico, protegendo as estruturas celulares. Além disso, desempenham um papel crucial na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS, *Reactive Oxygen Species*) e na integração de sinais envolvendo diferentes vias metabólicas (POLLE e CHEN *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2020, ATHAR *et al.*, 2022).

Dentre as diversas proteínas que atuam sobre o processo de tolerância das plantas à salinidade estão aquelas que compõem o Sistema de Transportadores de Membrana (STMs), o qual compreende um conjunto de proteínas especializadas, presentes majoritariamente na membrana plasmática (GILL *et al.*, 2021). As proteínas do STMs são codificadas por famílias multigênicas de transportadores, canais iônicos, bombas de transporte e carreadores, sendo essenciais na regulação do equilíbrio iônico, na absorção de nutrientes e na resposta à salinidade do solo (AMIN *et al.*, 2021; BANIK & DUTTA, 2023).

Outro componente importante na tolerância das plantas à alta salinidade são os carboidratos não estruturais (CNEs), que abrangem os carboidratos solúveis e o amido. Estes compostos orgânicos incluem açúcares simples, como glicose, glucose, frutose, manitol, sacarose, além de polióis e oligossacarídeos (JIAO *et al.*, 2020). Os CNEs atuam como osmólitos que auxiliam na manutenção do equilíbrio osmótico, promovendo aumento da retenção de água na planta (GIL *et al.*, 2013). Além disso, contribuem para a eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), pois detêm a capacidade de reagir com radicais hidroxila agindo como um antioxidante, bem como se integram a membrana celular prevenindo a peroxidação causada por ROS (KEUNEN *et al.*, 2013). Dessa forma, os CNEs minimizam o dano oxidativo, e atuam como moléculas sinalizadoras na regulação metabólica contra o principal estresse em questão (PELLEGRINI *et al.*, 2020). A síntese de açúcares solúveis é necessária para a manutenção da absorção hídrica dos tecidos vegetais e facilita a recirculação de Na⁺ das raízes para as folhas, auxiliando na sobrevivência da planta frente ao estresse (LIMA *et al.*, 2021). Os carboidratos não estruturais são amplamente distribuídos nos tecidos vegetais,

entretanto, sob condições de estresse salino tendem a se acumular no tecido radicular. Estudos sugerem que esse acúmulo está ligado a mecanismos adaptativos que contribuem para a tolerância ao aumento da concentração de Na^+ , incluindo sua translocação e compartimentalização em resposta à salinidade (SHAHID *et al.*, 2020).

A catingueira (*Cenostigma pyramidale*), é uma espécie representante da família Fabaceae, com ampla distribuição nas regiões semiáridas do Brasil. Tal fato se deve a sua adaptação a solos pedregosos, secos, muito salinos e pouco férteis (SANTOS *et al.*, 2021). Destaca-se como fonte de lenha e carvão vegetal, forrageira e para fins medicinais (CARVALHO *et al.*, 2023). É uma planta pioneira, de crescimento rápido, com grande potencial na recuperação de áreas degradadas e que apresentam alta tolerância à salinidade (FALCÃO *et al.*, 2015). Estudos fisiológicos têm ressaltado a impressionante capacidade da catingueira em remobilizar, rapidamente, o teor de Na^+ do tecido foliar e recuperar a concentração de K^+ horas após a submissão do estresse salino (LIMA *et al.*, 2021). Adicionalmente, estudos moleculares (FROSI *et al.*, 2018) com essa espécie revelaram vários genes associados ao equilíbrio hídrico e iônico sendo induzidos após imposição de alta salinidade (NaCl 100mM). Desta forma, a catingueira mostra-se como um excelente modelo vegetal a ser explorado em estudos de tolerância ao referido estresse.

Tendo em vista que os mecanismos celulares/moleculares de tolerância a salinidade são amplamente dependentes dos STMs, a identificação e análise de membros desses transportadores, como as famílias, *ABC transporters*, Aquaporinas, PUP (*Purine Permease*) e *P-type ATPase* foram os alvos moleculares avaliados nesse estudo. Os *ABC transporters* tem como função principal realizar o transporte de substâncias intracelulares, como Na^+ (DAHUJA *et al.*, 2021). As Aquaporinas essencialmente realizam a translocação de moléculas de água, contudo também podem ser capazes de mobilizar sais tóxicos (YEPE-MOLINA *et al.*, 2020). Os PUP detêm a capacidade de executar o transporte do fito-hormônio citocinina que ajuda a minimizar os efeitos causados pelo estresse salino (XIAO *et al.*, 2020). As proteínas codificadas pela família *P-type ATPase* são capazes de realizar o transporte de íons e cátions contra seu gradiente de concentração (MATALIN *et al.*, 2021). Adicionalmente, comprovando-se a dinâmica dos CNEs como componentes no sistema de tolerância da catingueira ao estresse salino, os genes sintetizadores e transportadores de CNEs se tornam alvos promissores para futuros estudos de caracterização funcional.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Salinidade dos solos e consequências sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal

Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization*), solos salinos estão presentes em todos os continentes. Ademais, as mudanças climáticas são um fator determinante na variação da salinidade do solo, com efeito significativo de mudanças nos padrões climáticos regionais e globais, na maioria das vezes influenciados pela ação antrópica (CORWIN *et al.*, 2021).

O aumento da concentração de sais nos solos, potencializado pelas mudanças climáticas, pode ser causado por alteração nos padrões de precipitação, ocasionando períodos de seca prolongados ou chuvas intensas e irregulares (OKUR e ÖRÇEN, 2020). Períodos de seca prolongados promovem altas taxas de evapotranspiração, intensificando a concentração de sais no solo. Por outro lado, chuvas intensas levam ao acúmulo de sais nas camadas profundas no solo. Outros fatores que contribuem para a salinização dos solos são com água salobra de poços da região irrigação o aumento do nível do mar, o qual acarreta a intrusão de água salgada em áreas costeiras, assim contribuindo para o aumento da concentração de sais nos solos próximos ao litoral (ESWAR *et al.*, 2021). Em decorrência desses fatores, os solos com altos teores de sal já atingem ~30 % das terras agrícolas irrigadas no mundo, e estima-se que em 2050 esse percentual atinja 50% (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2021).

O estresse salino é um grande problema para a produtividade das culturas, promovendo redução do crescimento, diminuição da qualidade/quantidade de colheitas, além de proporcionar maior suscetibilidade das plantas às doenças e pragas agrícolas (BUTCHER *et al.*, 2016). Diante disso, a salinidade do solo se mostra um desafio significativo para a produção agrícola, com impactos socioeconômicos severos (SINGH, 2022). Para os grandes produtores, o declínio das colheitas resulta em perdas substanciais na renda, como também afeta as cadeias de suprimento alimentar, com escassez de produtos e aumento dos preços. Já, para o pequeno agricultor, o qual utiliza o cultivo de subsistência, a perda da produção promove a insegurança alimentar da comunidade local e compromete sua principal fonte de renda (ZIERVOGEL *et al.*, 2010).

O estresse salino provoca diversos efeitos nas plantas, desencadeando uma série de mudanças fisiológicas, a exemplo da seca fisiológica, onde a alta concentração de sal no solo cria um gradiente osmótico desfavorável (devido a um meio externo hipertônico), dificultando a absorção de água pelas raízes comprometendo, assim, o desenvolvimento da planta (OKON *et al.*, 2019).

A alta salinidade também pode alterar o metabolismo dos lipídios, modificando a composição lipídica das membranas celulares, alterando sua fluidez (SHAHID *et al.*, 2020) impactando na sua integridade e na função de permeabilidade seletiva, dificultando a absorção de nutrientes, resultando em subnutrição (GARCIA-CAPARROS *et al.*, 2010). Assim, com a redução do potencial hídrico e a interferência na absorção de nutrientes (ex. nitrogênio e magnésio), o estresse salino pode levar à diminuição na concentração de pigmentos fotossintéticos, resultando na inibição da atividade fotossintética (SOLTABAYEVA *et al.*, 2020).

O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS/reactive oxygen species) também é provocado pelo excesso de sais, levando a danos oxidativos nas células e tecidos vegetais. Entre os efeitos dos ROS incluem-se a redução na expansão celular, na atividade metabólica, no fechamento dos estômatos, e na fotossíntese, levando à redução do crescimento, desenvolvimento, e rendimento das culturas (CHOUDHURY *et al.*, 2017).

Com base nesse conhecimento, aliado aos avanços em tecnologias ômicas (ex. genômica, transcritômica e proteômica), a identificação e análise de genes e proteínas envolvidos nesses processos tem sido uma estratégia eficiente na busca de plantas mais tolerantes a estresses como alta salinidade dos solos.

2.1 Consequências do estresse salino na fisiologia das plantas

O estresse salino é responsável por causar uma série de mudanças na fisiologia das plantas. Uma dessas alterações é a chamada seca fisiológica, que ocorre quando as raízes não conseguem manter o nível de absorção adequado de água devido à alta concentração de sal no solo, criando um gradiente osmótico desfavorável (OKON *et al.*, 2019). Isso acarreta células plasmolisadas e compromete o desenvolvimento saudável do organismo.

A alta salinidade também pode alterar o metabolismo dos lipídios, modificando a composição lipídica das membranas celulares e, consequentemente, alterando sua fluidez (SHAHID *et al.*, 2020). Isso impacta a integridade das membranas e sua função de permeabilidade seletiva, dificultando a absorção de nutrientes pelas células vegetais e resultando em subnutrição.

Devido à redução do potencial hídrico e à interferência na absorção de nutrientes, como nitrogênio e magnésio, causada pelo comprometimento das membranas, o estresse salino pode levar à diminuição na concentração de pigmentos fotossintéticos, resultando na inibição das atividades fotossintéticas (SOLTABAYEVA *et al.*, 2020). Uma elevada taxa de salinidade

também ocasiona o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, levando a danos oxidativos nas células e tecidos vegetais.

2.2 Mecanismo de respostas das plantas ao estresse salino

A alta salinidade induz estresse iônico de sódio (Na^+) no citosol, alterando a homeostase do íon potássio (K^+), comprometendo várias vias fisiobioquímicas e de desenvolvimento da planta (ALI *et al.*, 2021). As plantas desenvolveram mecanismos altamente refinados para manter a homeostase celular mesmo sob condições ambientais extremas, incluindo a alta salinidade (MISHRA *et al.*, 2024).

Esses mecanismos de tolerância à salinidade atuam em níveis fisiológicos, bioquímicos e moleculares para mitigar os efeitos negativos desse estresse abiótico (POLASH *et al.*, 2019). Entre essas estratégias, destaca-se a homeostase iônica e a compartimentalização, que envolvem a exclusão do íon sódio nas raízes e sua subsequente compartimentalização no vacúolo, prevenindo sua toxicidade celular (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2009). Esse processo é realizado por antiportadores Na^+/H^+ , cuja atividade depende do gradiente de prótons gerado por bombas H^+ -ATPase e H^+ -pirofosfatase.

A síntese de solutos compatíveis é outro mecanismo para a manutenção do equilíbrio osmótico, protegendo as estruturas celulares e as enzimas contra a desnaturação. Além de atuarem como osmoprotetores, esses compostos apresentam propriedades antioxidantes, auxiliando na neutralização de espécies reativas de oxigênio -ROS- (KEREPESI *et al.*, 2000). Adicionalmente, a resposta antioxidante constitui um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo induzido pela salinidade, que se caracteriza pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e peroxidase (POLASH *et al.*, 2018).

A regulação hormonal desempenha um papel fundamental na tolerância das plantas à salinidade. Os fitohormônios, por exemplo, estão envolvidos na regulação da abertura e fechamento estomático para minimizar a perda hídrica, na modulação da absorção de íons e na ativação de mecanismos antioxidantes (ULLAH *et al.*, 2018). Além disso, promovem a síntese de proteínas de defesa e regulam o crescimento vegetal em condições adversas (GURMANI *et al.*, 2011). Logo, a interação entre esses mecanismos contribui para a tolerância das plantas a ambientes salinos, garantindo a manutenção de suas funções fisiológicas e o desenvolvimento adequado.

Dentre os mecanismos de tolerância das plantas ao estresse salino, destaca-se o Sistema de Transportadores de Membrana (STM), composto por canais proteicos

transmembranares e bombas antiportadoras de Na^+/H^+ (MANSOUR *et al.*, 2014). Esse mecanismo desempenha um papel crucial na adaptação ao estresse salino, uma vez que suas proteínas estão localizadas na membrana plasmática, apontada por estudos como a primeira estrutura a detectar o aumento da concentração de sais no meio (AGHAEI e KOMATSU, 2013). Logo, ao perceber essa elevação, o STM é ativado como uma linha primária de defesa, prevenindo o acúmulo de sais tóxicos na célula e evitando desequilíbrios osmóticos e iônicos que comprometeriam a homeostase do organismo vegetal (JANICKA-RUSSAK, 2013).

Outro fator relevante na tolerância das plantas à salinidade é o acúmulo de carboidratos não estruturais e amido. Esses compostos, que incluem açúcares solúveis e de reserva, variam de monossacarídeos a polissacarídeos e desempenham um papel fundamental no metabolismo, crescimento e resposta das plantas a condições adversas, como o estresse salino (OLIVEIRA *et al.*, 2022). Além de servirem como principal fonte de energia para o metabolismo celular, em situações de estresse abiótico, como salinidade e seca, esses carboidratos atuam como osmolitos, auxiliando na manutenção do equilíbrio osmótico. Eles também regulam a sinalização ROS e protegem vias metabólicas envolvidas na eliminação de sais tóxicos (CAMILO-ALVES *et al.*, 2017). Ademais, os carboidratos não estruturais funcionam como moléculas sinalizadoras, modulando a expressão gênica e a resposta das plantas ao estresse salino (CHO e YOO, 2011).

2.2.1 Sistema de Transportadores de Membrana – STM

A membrana plasmática é um componente celular fundamental na regulação da homeostase celular, regulando o influxo e efluxo de íons e moléculas. Essa seletividade é conferida por um conjunto de proteínas transportadoras/carreadoras dispostas na bicamada lipídica. Essas proteínas especializadas constituem o Sistema de Transportadores de Membrana (STM) (GILL *et al.*, 2021). Os transportadores de membrana são classificados de acordo com suas moléculas que transportam, como íons, açúcares, transportadores de aminoácidos, além dos transportadores que regulam hormônios vegetais e metabólitos secundários (MISHRA *et al.*, 2024). Com base nessas propriedades, o STM apresenta papel fundamental na homeostase celular (ajustamento osmótico, homeostase iônica) direcionando o transporte de íons das raízes para demais partes da planta, transportando água e elementos minerais no xilema, transferindo açúcares pelo floema e absorvendo e desintoxicando metais pesados nas plantas (ZHAO *et al.*, 2020; MISHRA *et al.*, 2024). Esse sistema é regulado por famílias gênicas que codificam

proteínas de transporte (GANI *et al.*, 2020), cuja expressão é modulada por vias de sinalização sensíveis a diferentes tipos de estresses.

Entre os principais componentes do STM, as bombas de prótons geram um gradiente eletroquímico de H^+ através da membrana plasmática, estabelecendo a força motriz de prótons (HARUTA *et al.*, 2015). Esse gradiente é crucial para o transporte secundário de íons, como Na^+ , por meio de antiportadores e simportadores. O antiportador Na^+/H^+ , por exemplo, utiliza o gradiente de H^+ gerado pelas ATPases de H^+ para expulsar Na^+ da célula em troca de H^+ , contribuindo para a homeostase iônica (KUMARI *et al.*, 2020). Além disso, os transportadores de alta afinidade para K^+ (HKTs) desempenham papel essencial na manutenção do equilíbrio de Na^+ e K^+ , enquanto canais iônicos facilitam a passagem de diversos cátions através da membrana plasmática (RODRÍGUEZ-NAVARRO *et al.*, 2006). As Aquaporinas, por sua vez, são proteínas especializadas no transporte eficiente de água pelas membranas celulares, auxiliando na adaptação da planta a condições de estresse.

No contexto da tolerância ao estresse salino, os transportadores de membrana são responsáveis por manter a regulação de íons de sódio (Na^+) citoplasmáticos, remobilizar sais tóxicos, aumentar a absorção de água, a fim de manter o equilíbrio hídrico celular (AMIN *et al.*, 2021). Sob determinada condição de estresse, incluindo a salinidade, as plantas ativam famílias especializadas de genes de transportadores de membrana, como ATPases, Aquaporinas, transportadores ABC, permeases entre outros.

A eficiência do Sistema de Transportadores de Membrana na tolerância a estresse abióticos, como a alta salinidade, é evidenciada por diversos estudos. Pesquisas relatam que a superexpressão de genes codificadores de proteínas do STM resulta em maior tolerância ao sal, reduzindo o acúmulo de Na^+ nas folhas e mantendo elevados os níveis de K^+ em *Arabidopsis thaliana* (SHI *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2013). Resultados semelhantes foram observados em células de tabaco e arroz, onde a maior indução de genes do STM, como da família ABC e Aquaporina, contribuiu para a exclusão de Na^+ , a manutenção do potencial de membrana (ANIL *et al.*, 2007; NGUYEN *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018) e do gradiente de prótons essencial para o transporte ativo de íons (OBATA *et al.*, 2007), além de contribuir para a regulação do fluxo de água e a osmorregulação sob estresse salino (XU *et al.*, 2014).

2.2.1.1 Transportadores ABC (*ABC transporters*)

Os transportadores ABC (*ABC transporters*) são uma classe de proteínas de membrana responsáveis pelo efluxo de substâncias intracelulares, principalmente Na^+ . Predominantemente localizados nas membranas celulares, esses transportadores desempenham um papel essencial na remobilização do sal dentro das células, contribuindo para a tolerância das plantas ao estresse salino. Logo, os *ABC transporters* se mostram de grande importância para a manutenção do equilíbrio osmótico e iônico, impactando positivamente na fisiologia das plantas diante frente a estresses (ZHANG *et al.*, 2020; DAHUIJA *et al.*, 2021). A estrutura dos transportadores ABC em plantas é composta por dois domínios de ligação a nucleotídeos (NBDs) e dois domínios transmembranares (TMDs). Os NBDs são hidrofílicos e contêm diversos motivos conservados, enquanto os TMDs são hidrofóbicos e apresentam baixa homologia. Para que os transportadores ABC realizem a translocação de substâncias, os NBDs fornecem energia por meio da ligação e hidrólise do ATP, enquanto os TMDs desempenham a função de selecionar os substratos a serem transportados através das membranas, utilizando o canal de energia gerado (ZHANG *et al.*, 2020).

2.2.1.2 Aquaporinas (*AQPs*)

As Aquaporinas (AQPs) são proteínas de canais, que desempenham função principal de permitir o transporte de água através das membranas celulares, sendo de total importância para manter a homeostase celular (QIN *et al.*, 2019; YEPE- MOLINA *et al.*, 2020). Essas proteínas ocorrem nas plantas em múltiplas isoformas que refletem sua diversidade de localização subcelular, seletividade de transporte além de propriedades de regulação. Nas células vegetais, as Aquaporinas podem ser encontradas na membrana plasmática, retículo endoplasmático, vacúolos e plastídios (MAUREL *et al.*, 2015).

Essas proteínas de canais não se limitam ao transporte de água sendo capaz de translocar gases dissolvidos, metaloides e compostos orgânicos (SADE *et al.*, 2017). Dessa forma, ajudam a manter a homeostase do organismo, pois contribuem na regulação hídrica, osmótico e iônica das células (GAUTAM *et al.*, 2021).

Sob condições de alta salinidade a expressão de AQPs tende aumentar, com maior acúmulo na membrana plasmática e no tonoplasto (CHENG *et al.*, 2021; JIA *et al.*, 2020). Esse grupo proteico é classificado em cinco subfamílias, a citar: proteínas análogas à nodulina (NIPs), proteínas intrínsecas básicas (SIPs), proteínas intrínsecas da membrana plasmática

(PIPs), proteínas intrínsecas do tonoplasto (TIPs), proteínas intrínsecas não caracterizadas (XIPs) (XU *et al.*, 2020).

2.2.1.3 Permeases de Purinas (*Purine Permease, PUP*)

As Permeases de Purinas (*Purine Permease, PUP*) constituem uma família de transportadores de membrana predominantes em plantas vasculares. Sua função foi inicialmente reconhecida pela captação e transporte de nucleotídeos purinas e seus derivados (XIAO *et al.*, 2019). No entanto, pesquisas recentes apontam que as PUPs desempenham um papel essencial no transporte do hormônio citocinina (XIAO *et al.*, 2020). As citocininas são fundamentais no crescimento e desenvolvimento das plantas, também participando na mitigação dos efeitos do estresse salino (KESHISHIAN *et al.*, 2022). Suas funções se estendem à manutenção do equilíbrio hormonal, ativando vias de sinalização e regulando a expressão de genes associados ao estresse salino, além de influenciarem no metabolismo e no equilíbrio iônico (LIU *et al.*, 2018). Assim, ao favorecer a eficiência do transporte de citocininas nas plantas, a família PUP contribui para a tolerância das plantas ao estresse salino. Transcritos da família PUP utilizam um sistema de transporte altamente seletivo para purinas, que é acoplado ao transporte de prótons H^+ . Esse processo é impulsionado pela hidrólise do ATP, fornecendo a energia necessária para o transporte contra o gradiente de concentração (QI *et al.*, 2013). Membros da família PUP são proteínas transmembranares (membrana plasmática e do retículo endoplasmático) que permitem a interação do ambiente intracelular e extracelular (ROMANOV *et al.*, 2021).

2.2.1.4 Atepasas do tipo P (*P-type ATPase*)

As Atepasas do tipo P (*P-type ATPase*) são classificadas como transportadores integrantes das membranas que desempenham papéis fundamentais no transporte transmembranar em plantas (ZHANG *et al.*, 2020). Localizados majoritariamente na membrana plasmática e no tonoplasto, sendo comuns no tecido radicular das plantas (WANI *et al.*, 2020). As *P-type ATPase* funcionam como bombas de antiporter de Na^+/H^+ energizadas através da hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) e são capazes de realizar a translocação de íons e cátions mesmo contra seus gradientes de concentração (MATALIN *et al.*, 2021). Além disso, as *P-type ATPase* desenvolvem papel importante na tolerância das plantas ao estresse salino, visto que contribuem para a redução da concentração de Na^+ nas células, através do transporte desse íon

contra o gradiente eletroquímico do citosol para o vacúolo ou apoplasto (XU *et al.*, 2020). Ademais, estão envolvidas no controle estomático, contribuindo para a exclusão de íons salinos, bem como na absorção de água, a fim de manter o equilíbrio hídrico e osmótico do organismo (ZHAO *et al.*, 2020).

2.2.2 Carboidratos não estruturais (CNEs)

Os carboidratos não estruturais (CNEs) são compostos orgânicos fundamentais ao funcionamento das plantas. Tais carboidratos abrangem açúcares solúveis como glicose e frutose e separadamente o amido, sendo esse último uma forma de armazenamento de energia nos vegetais. Os açúcares solúveis atuam na regulação osmótica, transporte de energia, transdução de sinais e síntese de compostos (DU *et al.*, 2020).

O amido como molécula energética, mantém as funções do organismo sob condições de estresse. A sua quebra fornece energia, açúcares e metabolitos que auxiliam na sobrevivência do vegetal a condições estressante e sua síntese permite reservar carbono para uso futuro, desse modo evitando consumo respiratório excessivo (THALMANN *et al.*, 2017).

Os carboidratos não estruturais também participam da síntese de compostos de defesa das plantas como resinas e terpenos. Esses açúcares fornecem energia para síntese dos compostos de defesa e funcionam como substrato dos compostos secundários (OMARI, 2021). Esses compostos são sintetizados em diferentes tecidos da planta e desempenham um papel importante na proteção contra predadores e patógenos. Ademais, os CNEs também são importantes para minimizar efeitos nocivos de estresses abióticos, como a alta salinidade. Em relação ao estresse salino, esses atuam no controle de danos promovidos por tal estresse (PELLEGRINI *et al.*, 2020), funcionando como substâncias osmoreguladoras a fim de manter o equilíbrio osmótico, eliminando radicais livres. Dessa forma, atenuam o estresse oxidativo que se acumulando na região radicular com o intuito de regularizar o potencial hídrico e manter a captação de água (LIMA *et al.*, 2021).

2.3 A catingueira como modelo de tolerância à salinidade

A *Cenostigma pyramidale* (Tul.) E. Gagnon & G. P. Lewis, popularmente conhecida como catingueira, é uma espécie da família Fabaceae. Em relação à sua morfologia, a catingueira é uma árvore de médio a grande porte. Suas folhas são compostas e alternadas, com folíolos que variam de ovais a lanceolados, caracterizados por um limbo estreito e alongado,

afileando-se em uma ponta (semelhante a uma lança). Apresenta inflorescência do tipo racemo e frutos do tipo legume (FILHO *et al.*, 2023).

É considerada uma planta pioneira, como sendo uma das primeiras a colonizar áreas após impactos ambientais, o que evidencia sua notável capacidade de tolerância a diferentes tipos de estresses (RIBEIRA *et al.*, 2021). Por ser uma espécie de locais de clima semiárido, a catingueira passou por pressões seletivas que lhe conferiram características essenciais para suportar as adversidades desse ambiente. Entre as características adaptativas estão a produção de ceras espiculares, presença de tricomas nas folhas, um sistema radicular profundo e a capacidade de acumular carboidratos solúveis (NASCIMENTO *et al.*, 2024).

A Catingueira apresenta uma alta plasticidade fenotípica, logo detém a capacidade de ajustar suas características funcionais em respostas a condições ambientais adversas como o estresse por seca e salinidade que são muito presentes em sua região típica (VILELA *et al.*, 2021). Alguns atributos fisiológicos que esta espécie regula para tolerar essas adversidades naturais são, o potencial hídrico foliar, a condutância estomática, a eficiência no uso de água e a eficiência no uso de nutrientes, assim mantendo suas funções fisiológicas regulares frente a esses tipos de estresses abióticos (FALCÃO *et al.*, 2015).

Na região nordeste do Brasil, a alta salinidade é uma condição comum, onde a catingueira é abundante e considerada uma das espécies mais adaptadas para esta região. Para se adaptar a solos com altas concentrações salinas, a catingueira desenvolveu uma série de mecanismos para minimizar os efeitos desse estresse, como: regulação salina, resistência osmótica, exclusão de íons, acúmulo de solutos e remobilização de Na^+ foliar (LIMA *et al.*, 2021). Além disso, a catingueira reduz a perda de água através do fechamento dos estômatos, diminuindo a condutância estomática e mantendo taxas basais de fotossíntese, apresenta alta eficiência no uso de água, maximizando a fotossíntese com mínima perda de água por transpiração e possui um sistema radicular bem desenvolvido, que lhe permite acessar água em camadas mais profundas do solo, especialmente em áreas de estágio sucessional tardio (FALCÃO *et al.*, 2015).

2.4 Bioinformática e análises moleculares em estudos de estresse salino em plantas

A bioinformática é uma ciência multidisciplinar abrangendo a área da biologia, computação e informática, com o objetivo de analisar e interpretar dados biológicos. Através de suas ferramentas computacionais é possível coletar, visualizar, organizar e analisar informações como sequências de DNA e proteínas, estruturas moleculares, expressão gênica e

interação entre biomoléculas (GAUTHIER *et al.*, 2019). Devido a essa incrível capacidade de processamento de grande quantidade de dados, a bioinformática tem possibilitado o estudo das diferentes ômicas e possibilitando uma análise abrangente, em larga escala, de dados biológicos de categorias distintas, como a genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica, entre outras (VAILATI-RIBONI *et al.*, 2017). As ômicas desempenham papel essencial para a compreensão dos sistemas biológicos em sua máxima, fornecendo novos *insights* e abordagens sobre a expressão gênica, as interações proteicas, as vias metabólicas e características funcionais do organismo.

Dentre todas as diferentes ômicas, a transcriptômica destaca-se pela possibilidade de entender a modulação da expressão gênica. Tal estratégia tem como foco a análise do transcriptoma, que consiste no conjunto de transcritos das células, incluindo mRNAs (MISRA *et al.*, 2019). Dessa forma, por meio da transcriptômica é possível: identificar dinâmicas de expressão gênica, estudar mudanças de expressão as quais refletem “decisões” fisiológicas, determinar a estrutura transcricional dos genes e catalogar diferentes tipos de transcritos, quantificar níveis de expressão de transcritos específicos em diferentes condições e fases de desenvolvimento.

Ademais, as análises moleculares são de grande importância para compreender os mecanismos de tolerância ao estresse salino em plantas, visto que através desse tipo de análise é possível a identificação de genes, proteínas e vias metabólicas envolvidas na resposta a salinidade e revelam padrões de expressão gênica. Duas técnicas moleculares que destacam nesse tipo de estudo são: qPCR e RNA-Seq.

A técnica de qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) é utilizada para amplificar e quantificar DNA/RNA em tempo real com alta precisão e sensibilidade, consequentemente sendo apontada como padrão-ouro em estudos de expressão gênica e demais pesquisas genômicas (BUTZ *et al.*, 2019). Essa técnica também se destaca por sua versatilidade, podendo desde detectar a variação no número de cópias e metilação de DNA até a validação de biomarcadores (PABINGER *et al.*, 2014).

Em relação ao RNA-Seq, é uma técnica de sequenciamento de nova geração que analisa a expressão e estrutura de RNAs em larga escala. O seu aspecto revolucionário foi permitir a caracterização abrangente e quantitativa de transcriptomas com resolução em nível de nucleotídeo, superando as limitações de técnicas anteriores como microarrays e SAGE (HRDLICKOVA *et al.*, 2017). O RNA-Seq possibilita a identificação de genes diferencialmente expressos, a detecção de isoformas de splicing alternativo, RNAs não codificantes e fusões

gênicas, além de oferecer um amplo dinamismo de detecção e menor ruído de fundo (COSTA *et al.*, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a expressão gênica e as alterações metabólicas no tecido radicular de *C. pyramidale* sob estresse salino, por meio da caracterização *in silico* e experimental de membros do Sistema de Transportadores de Membrana (STM), além da quantificação de carboidratos não estruturais em diferentes tempos de exposição ao NaCl.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar e estabelecer um perfil de expressão *in silico* para os transcritos das famílias ABC (*ABC transporters*), Aquaporinas (AQPs), PUP (*Purine Permease*) e *P-type ATPase* no transcriptoma radicular de *C. pyramidale* já disponível.
- Validar, via RT-qPCR, a expressão diferencial de transcritos associados às famílias gênicas estudadas sob estresse salino.
- Avaliar a concentração de carboidratos não estruturais no tecido radicular da Catingueira após a aplicação de estímulo de excesso de sal com NaCl 100mM.

4 METODOLOGIA

4.1 Análises *in silico*

4.1.1 Mineração de transportadores de membrana no transcriptoma da catingueira

Os transcritos associados às famílias de transportadores de membrana foram minerados no banco de dados do transcriptoma radicular de *C. pyramidale* gerado pelo grupo do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV/UFPE). Este banco foi gerado a partir de plantas da catingueira submetidas ao estresse salino (solução salina, NaCl 100 mM) por até 11 dias (tempo máximo de estresse) (FROSI *et al.*, 2018). Ao total, bibliotecas (paired-end, 2x300 pb, Illumina) foram geradas, a partir dos seguintes tratamentos: controles (Ct30min e Ct11d, controles 30 min e 11 dias); Estresse salino (Salt30min, Salt2h e Salt11d; estresse salino após 30 min, 2h e 11dias, respectivamente). Para cada condição analisada, houve o emprego de triplicatas biológicas, resultando em um total de 15 bibliotecas RNA-Seq. A biblioteca “Ct30min”, serviu como controle para os tempos iniciais (Salt30min e Salt2h). Após a montagem “de novo” do transcriptoma, foram obtidos 890.051 transcritos traduzidos associados a 746.849 unigenes. Para mineração dos transcritos alvos foi realizado um BLASTp (e-value < e^{-20}) entre sondas das famílias *ABC transporters*, Aquaporinas, *Purine Permease* e *P-type ATPase*. Os conjuntos de sondas foram obtidos do banco de dados “*Arabidopsis Membrane Protein Library*” (disponível em: <http://wardlab.cbs.umn.edu/arabidopsis/>). Somente o best-hit foi considerado para cada sonda com similaridade estatisticamente significativa.

4.1.2 Análise *in silico* da expressão diferencial

A análise de expressão diferencial para os alvos em cada tratamento foi realizada contra seu respectivo controle, usando-se o *software* edgeR (ROBINSON *et al.*, 2009). Foram considerados diferencialmente expressos (DE) (UR, up-regulated e DR, down-regulated) transcritos que apresentaram $-1 \geq \text{Log2FC} \geq 1$ ($p < 0,05$ e $\text{FDR} < 0,05$) considerando-se os diferentes contrastes (tratamento vs controle).

4.1.3 Anotação funcional dos transportadores de membrana diferencialmente expressos

Para a recuperação dos termos GO, foi utilizado a ferramenta GENE ONTOLOGY (ASHBURNER *et al.*, 2000; ALEKSANDER *et al.*, 2023), que identifica termos GO significativamente representados em um determinado conjunto de transcritos. Tal ferramenta aplica uma distribuição hipergeométrica (neste caso: $p < 0,05$) e uma correção de FDR (neste caso: $FDR < 0,05$) para identificação dos processos biológicos, funções moleculares e compartimentos celulares nos quais os transcritos analisados estão associados. Neste estudo foi dada preferência à categoria “processos biológicos”.

4.1.4 Análise de similaridade e ortologia dos transportadores de membrana com QTLs

Visando agregar valor biológico e potencial biotecnológico aos transcritos de *ABC transporters*, Aquaporinas, PUP e *P-type ATPase* minerados, os dados foram contrastados contra CDSs (*coding sequences*) ancoradas em regiões de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) no genoma de referência de soja (Wm82.a2.v1). A presente análise consistiu da mineração na base de dados SoyBase, especificamente na seção “List of GWAS QTL” (<https://www.soybase.org/GWAS/list.php>). Tal seção apresenta regiões de QTLs ancoradas no genoma de referência de soja, categorizadas por característica que influenciam. Para a presente análise, centrou-se esforços em QTLs associados à tolerância ao estresse salino. Foram recuperados, via opção “Download track data across region (Gm0X:XX..XX)” e processamento de arquivo em formato Genbank, todos os IDs (formato Glyma.XXgXXXXXX.X) dos genes models existentes a 500 Kb up- e downstream dos SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) associados aos respectivos QTLs. Para o genoma da soja, tal medida física está associada a uma medida genética de ~1 cM (sentimorgan) – PMID: 16381975 – (SHULTZ *et al.*, 2006), sendo 1cM equivale a 1% de chance de que um marcador em um cromossomo se separe de um segundo marcador no mesmo cromossomo, devido a cruzamento em uma única geração (Robinson, 1998; <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/centimorgan>). As CDSs recuperadas foram, portanto, co-localizadas com os SNPs em questão, tendo sua posição revelada via gBrowser da plataforma SoyBase.

Os IDs obtidos foram usados para executar o *download* de sequências de mRNA (na base de dados SoyBase; <https://www.soybase.org/>) para posterior construção de banco de dados local. Após esse procedimento, executou-se um BLASTp (cutoff e-20) entre sequências

recuperadas (obtidas do genoma de soja traduzido e os transcritos traduzidos expressos codificadores de *ABC transporters*, Aquaporinas, PUP e *P-type ATPase*, também traduzidos. Posteriormente, realizou-se a análise de ortologia entre ABC, AQPs, PUP e *P-type ATPase* de catingueira e CDS contidas nas regiões analisadas, via programa orthofinder (EMMS *et al.*, 2019).

4.1.5 Seleção e desenho de *primers* para análise de expressão diferencial via RT-qPCR

O desenho dos *primers* específicos para os genes alvos foi realizado pela ferramenta online Primer3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), os *primers* foram desenhados apenas para os alvos que foram induzidos nos dados *in silico*, utilizando-se as especificações padrões: tamanho do *amplicon* de 80 a 150 pb; temperatura de anelamento de 58°C (mínimo), 60°C (ótimo) e 62°C (máximo), e conteúdo de GC de 45 a 55%.

4.2 Análises moleculares

4.2.1 Material vegetal e tratamentos

Sementes de *Cenostigma pyramidale* foram gentilmente cedidas pelo Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD) – UNIVASF/Petrolina-PE, Brasil. As sementes foram desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio (0,5%) e semeadas em areia lavada, em tubetes, na casa de vegetação do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV), Recife, PE. Após 11 dias, as plantas foram transferidas para vasos contendo 5 kg de areia lavada. As plantas foram mantidas sob condições controlada de irrigação, visando manter a saturação em níveis similares ao da capacidade de campo do substrato (80%). A cada 7 dias as plantas foram irrigadas com solução nutritiva de Hoagland (EPSTEIN; BLOOM, 2005), visando fornecimento de nutrientes necessários ao pleno desenvolvimento. Após 5 meses de completo desenvolvimento, para avaliar os efeitos do estresse salino em distintas escalas temporais, os exemplares de Catingueira foram expostos a NaCl 100mM por três períodos distintos: 30 minutos, 2 horas e 11 dias. As plantas foram organizadas em cinco grupos, sendo três submetidos ao tratamento salino e dois mantidos como controles (os tratamentos de 30 minutos e 2 horas compartilharam o mesmo grupo controle). Por fim, as plantas foram utilizadas para dois experimentos: i) análise de expressão diferencial de membros do sistema de

transportadores de membranas (STMs), por RT-qPCR e ii) dinâmica de carboidratos não estruturais no tecido radicular.

4.2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total do tecido radicular da Catingueira foi extraído segundo o protocolo descrito por Chang *et al.*, (1993). Aliquotas RNA (1ug) de cada amostra (em triplicata) foram convertidas em cDNA, utilizando-se o kit Improm-II Reverse Transcriptional System (Promega), conforme as especificações do fabricante. As amostras foram preparadas em triplicata biológica, armazenadas em freezer -20, até a realização das reações de RT-qPCR.

4.2.3 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

As reações de RT-qPCR foram preparadas com 1 µL de cDNA, (5 µL) de qPCR Master Mix 2x, 1 µL de cada *primer*, em um volume final de 10 uL (H₂O ultrapura). As reações foram realizadas no equipamento CFX96 Touch™ *Real-Time PCR Detection System* Bio-Rad Laboratories, programado para: 95°C por 2 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 15 seg. As curvas de dissociação (60-95°C por 20 min) foram avaliadas para confirmação da especificidade dos *primers*. As reações foram realizadas em triplicata (biológicas e técnicas). Utilizou-se dois genes de referência (SAC1 e HAG2) (FROSI *et al.*, 2021) para a análise de expressão relativa, a qual foi escrutinada pelo *software* REST- *Relative Expression Software Toll*, v 2.0.7), de acordo com as orientações do MIQE (*The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN *et al.*, 2009).

4.3 Análise bioquímica de carboidratos não estruturais (açúcares solúveis) e amido

A fim de verificar alterações nas concentrações de açúcares solúveis totais e amido entre os grupos estresse e controle, ao longo dos diferentes tempos de estresse, o conteúdo de açúcar solúvel foi avaliado utilizando-se 25 mg de massa radicular, normalizado para cada tratamento. Amostras de cada tratamento (30 minutos, 2 horas, 11 dias) foram maceradas até a obtenção de pó fino, com adição de 1,2 mL de etanol 80%. As amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria a 70°C, por 90 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.500

g por 10 minutos, e o sobrenadante coletado e transferido para novo *eppendorf* (DUBOIS *et al.*, 1956). Para nova centrifugação foi adicionado 600 µl de etanol 80% ao pellet.

Para a quantificação do amido, foi utilizada a fração insolúvel dos carboidratos solúveis totais, onde o *pellet* foi hidrolisado com a enzima amiloglucosidase (10U) por 1h. Em seguida, procedeu-se a análise. Todas as amostras foram medidas no comprimento de onda de 487nm, com a ajuda de Geneses 10S UV-Vis, Thermo Scientific, o equipamento opera na faixa de comprimento de onda de 190 a 1100 nm.

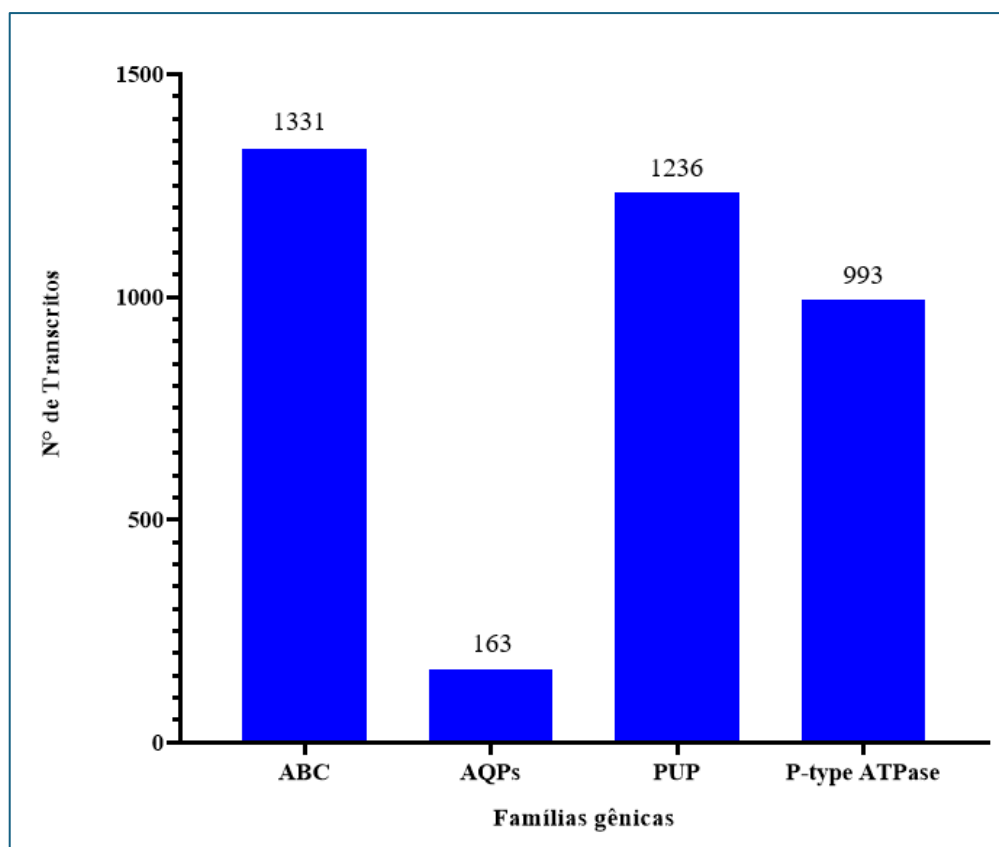
O experimento foi conduzido de forma inteiramente casualizada. Para avaliar a concentração de carboidratos solúveis totais e amido em cada um dos tempos de estresse (2h e 11 d) e tratamentos (controle e estressado) foi realizada uma ANOVA fatorial. Além disso, para aqueles resultados que deram significativos no teste da ANOVA, foi realizado o teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$), a fim de determinar quais grupos apresentaram diferença estatística significativa. As análises foram executadas no programa Statistica 8.0 (StatSoft. Inc, Oklahoma, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Identificação e expressão diferencial dos transportadores de membrana

No conjunto de dados analisados, foi possível a identificação de um total de 3.723 transcritos expressos pertencentes às quatro famílias gênicas de interesse. Desse montante, 1.331 são da família ABC, 163 Aquaporinas, 993 de *P-type ATPase* e 1.236 da família PUP, como pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1 – Número de transcritos expressos em cada família gênica: *ABC transporters (ABC)*; Aquaporinas (AQPs); *Purine Permease (PUP)* e *P-type ATPase*, na Catingueira sob estresse salino.



Fonte: O autor (2024).

Para cada uma das famílias gênicas procedeu-se a contagem dos transcritos constitutivos e diferencialmente expressos (DE) em cada tratamento (Figuras 2 e 3).

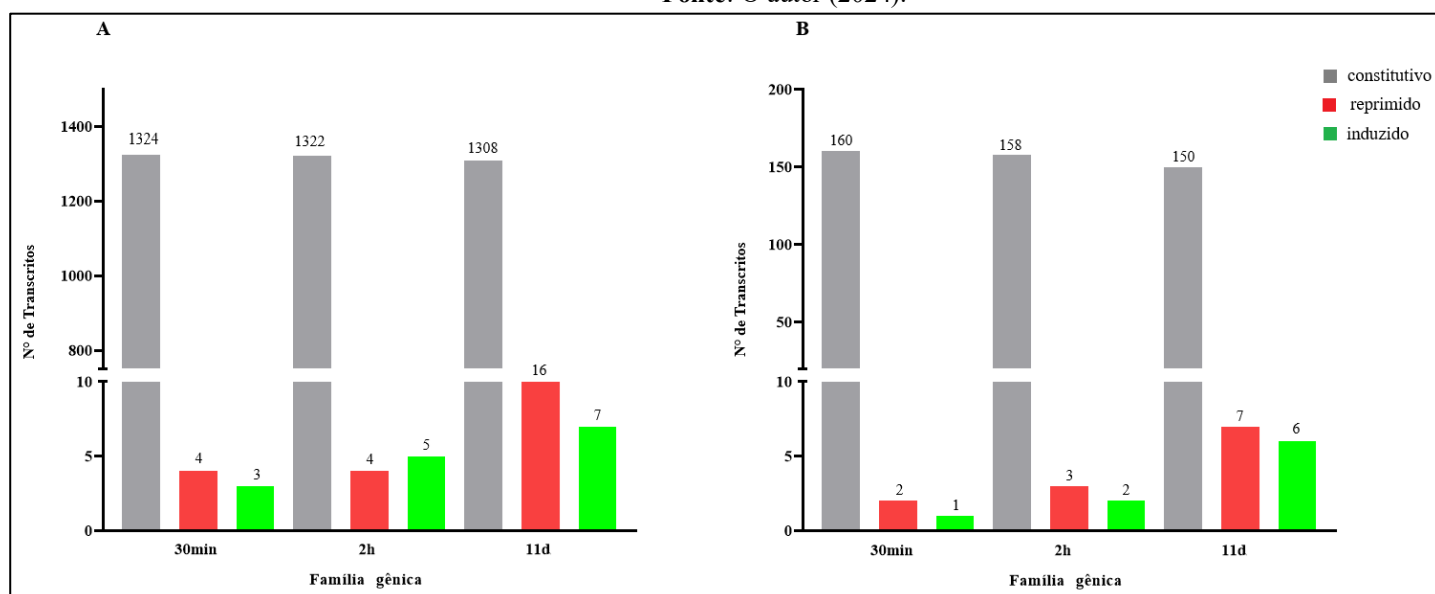
Para a família *ABC transporters*, no tratamento de 30 min de estresse, 1.324 transcritos foram constitutivos, quatro reprimidos e três induzidos (Figura 2A). No tratamento de 2 horas, foram identificados 1.322 constitutivos, quatro reprimidos e cinco induzidos (Figura 2A). Para

o tratamento de 11 dias de estresse, por sua vez, foram identificados 1.308 transcritos constitutivos, 16 reprimidos e sete induzidos associados aos *ABC transporters* (Figura 2A).

Quanto às Aquaporinas (AQPs), para o tratamento inicial (30 min) foram detectados 160 transcritos constitutivos, 2 reprimidos e apenas um induzido (Figura 2B). Em relação ao tratamento de 2 horas foram obtidos 158 constitutivos, três reprimidos e dois induzidos (Figura 2B). Por fim, para o tratamento de 11 dias, foi constatado 150 AQPs constitutivas, sete reprimidas e seis induzidas (Figura 2B).

Figura 2 – Número de transcritos constitutivos (TC), reprimidos e induzidos em cada uma das famílias gênicas *ABC transporters*-ABC (2A) e Aquaporinas – AQPs (2B), em cada tratamento aplicado.

Fonte: O autor (2024).

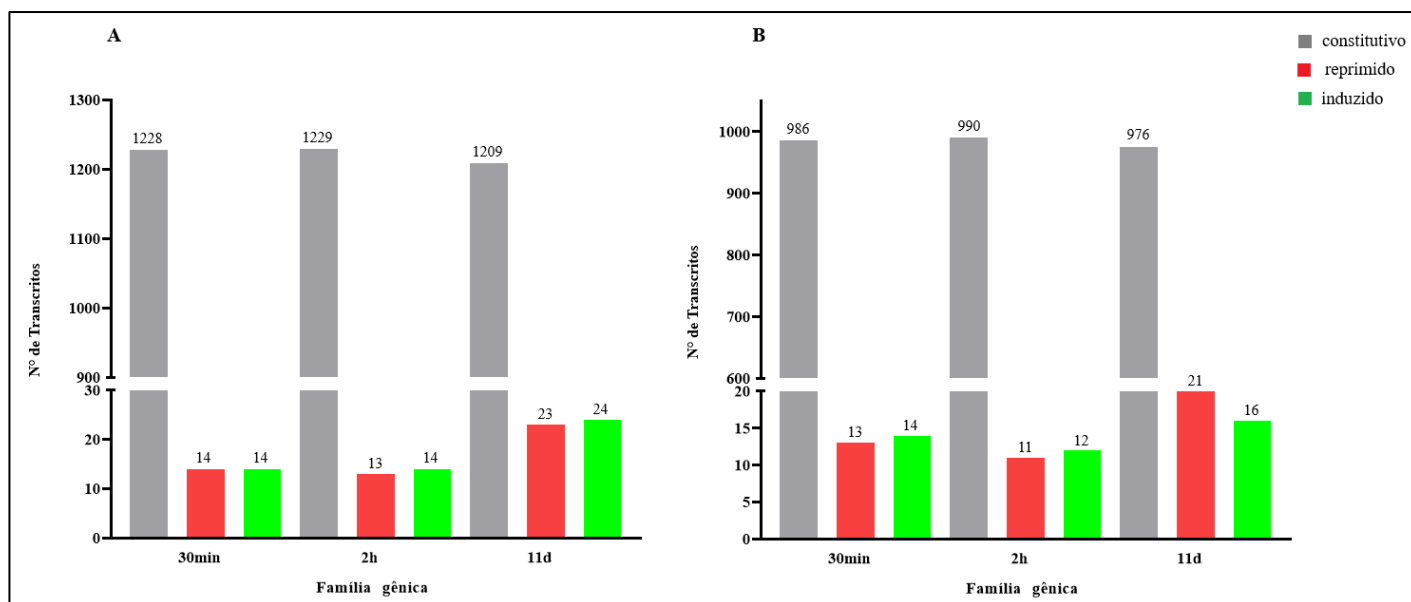


Para os transcritos PUP, no tratamento de 30 minutos, foram obtidos 1.228 constitutivos, quatro reprimidos e quatro induzidos (Figura 3A). Referente ao tratamento de duas horas, foram identificados 1229 constitutivos, três reprimidos e quatro induzidos (Figura 3A). Em relação ao tratamento de 11 dias, foram identificados 1209 transcritos constitutivos, treze reprimidos e quatorze induzidos associados aos PUP (Figura 3A).

No tocante às *P-type ATPase*, para o tratamento inicial foram detectados 986 transcritos constitutivos, 3 reprimidos e 4 induzidos (Figura 3B). Em relação ao tratamento de duas horas, foram minerados 990 *P-type ATPase* constitutivos, apenas um reprimido e quatro induzidos (Figura 3B). Por último, para o tratamento de 11 dias, foi constatado 976 *P-type ATPase* constitutivas, onze reprimidas e seis induzidas (Figura 3B).

Figura 3 – Número de transcritos constitutivos, reprimidos ou induzidos para cada uma das famílias gênicas PUP e *P-type ATPase*, para cada tratamento aplicado. Perfil de expressão dos transcritos codificadores de *Purine Permease* (A) e *P-type ATPase* (B) para cada tratamento analisado.

Fonte: O autor (2024).



5.2 Termos GO (*Gene Ontology*) dos transcritos diferencialmente expressos *in silico*

Através da ferramenta GENE ONTOLOGY foi realizado análise de processos biológicos associados a *ABC transporters*, Aquaporinas, *Purine Permease* e *P-type ATPase* induzidos, em cada tempo de estresse.

Dos 94 transcritos diferencialmente expressos investigados, 62 (68%) foram associados a um termo GO. No geral, os transcritos foram vinculados aos seguintes processos biológicos (**Tabela 1**): transporte transmembranar, transporte de água e transporte de fluidos, autofosforilação de proteínas, fosforilação de peptidil-serina, transdução de sinal intracelular, transporte transmembranar de cátions monoatômicos e atividade de aciltransferase.

Transcritos da família *ABC transporters* estão associados ao termo GO que indica apenas função de transporte transmembranar, enquanto os transcritos de Aquaporinas estão correlacionados ao referido termo GO anterior, além dos que indicam função de transporte de água e transporte de fluidos. Ademais, os transcritos da família PUP estão associados ao termo GO que indica função de autofosforilação de proteínas, fosforilação de peptidil-serina, transdução de sinal intracelular. Por fim, os transcritos de *P-type ATPase* estão correlacionados a transporte transmembranar de cátions monoatômicos e atividade de aciltransferase.

Tabela 1 - Distribuição de termos de ontologia gênica (GO) para os transcritos diferencialmente expressos de *ABC transporters* (ABC), *Aquaporinas* (AQPs), *Purine Permease PUP* e *P-type ATPase*.

Transcrito ID	Família Gênica	Termo GO	Processo biológico associado
TR217432_c0_g1_i2	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR24328_c0_g1_i6	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR177995_c0_g3_i3	AQPs	GO:0055085	Transporte transmembranar
		GO:0006833	Transporte de água
TR25074_c0_g1_i4	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR140508_c0_g2_i1	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
		GO:0055085	Transporte transmembranar
TR293042_c0_g4_i2	AQPs	GO:0006833	Transporte de água
		GO:0055085	Transporte transmembranar
TR23887_c1_g3_i2	AQPs	GO:0006833	Transporte de água
		GO:0042044	Transporte de fluidos
TR102425_c1_g1_i3	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR24984_c0_g2_i1	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR25040_c0_g2_i2	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR256435_c0_g7_i1	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
		GO:0055085	Transporte transmembranar
TR255921_c0_g5_i6	AQPs	GO:0006833	Transporte de água
		GO:0042044	Transporte de fluidos
TR139956_c0_g1_i1	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR25074_c0_g1_i4	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR176148_c0_g1_i1	AQPs	GO:0006833	Transporte de água
		GO:0042044	Transporte de fluidos
		GO:0055085	Transporte transmembranar
TR24596_c0_g1_i1	AQPs	GO:0006833	Transporte de água
		GO:0042044	Transporte de fluidos
		GO:0055085	Transporte transmembranar
TR294551_c0_g3_i2	AQPs	GO:0006833	Transporte de água
		GO:0055085	Transporte transmembranar
TR177995_c0_g3_i1	AQPs	GO:0006833	Transporte de água
TR177995_c0_g3_i1	AQPs	GO:0042044	Transporte de fluidos
		GO:0055085	Transporte transmembranar
TR102112_c1_g2_i4	AQPs	GO:0006833	Transporte de água
		GO:0042044	Transporte de fluidos
TR138214_c0_g1_i2	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR63573_c0_g1_i1	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR102415_c0_g1_i2	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR320742_c1_g1_i1	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR139250_c0_g1_i5	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR218007_c1_g1_i1	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR99414_c0_g1_i2	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR22599_c2_g4_i1	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
TR320360_c1_g3_i1	ABC	GO:0055085	Transporte transmembranar
		GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
TR101055_c1_g1_i5	PUP	GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
		GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
TR102426_c1_g3_i1	PUP	GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina

		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR294773_c2_g1_i1	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR256293_c0_g1_i10	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR254589_c0_g2_i19	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR217109_c0_g1_i4	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR175176_c0_g3_i1	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR254903_c0_g1_i2	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR25154_c0_g1_i4	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR217113_c0_g1_i1	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR178689_c1_g1_i1	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR178095_c0_g1_i5	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR139372_c3_g1_i3	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR320261_c0_g1_i1	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR320457_c0_g1_i3	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR320322_c0_g1_i4	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR138708_c0_g1_i1	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR293392_c0_g1_i2	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
TR255707_c0_g1_i5	PUP	GO:0046777	Autofosforilação de proteínas
		GO:0018105	Fosforilação de peptidil-serina
		GO:0035556	Transdução de sinal intracelular
		GO:0046777	Autofosforilação de proteínas

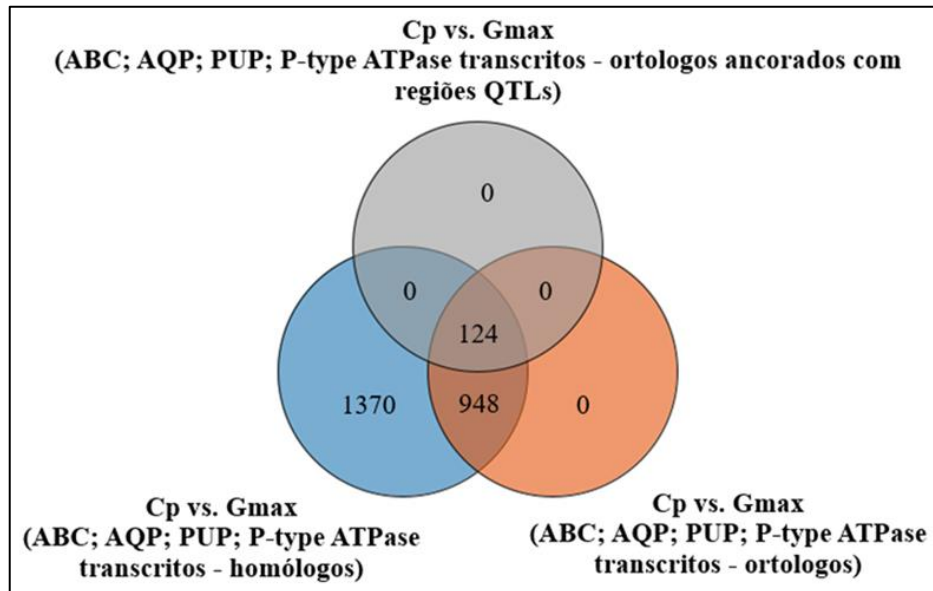
TR178761_c0_g1_i3	PUP	GO:0018105 GO:0035556	Fosforilação de peptidil-serina Transdução de sinal intracelular
TR217351_c1_g1_i1	P-type ATPase	GO:0016747 GO:0098655	Transporte transmembranar de cátions monoatômicos Atividade de aciltransferase
TR24680_c0_g2_i5	P-type ATPase	GO:0016747 GO:0098655	Transporte transmembranar de cátions monoatômicos Atividade de aciltransferase
TR24680_c0_g2_i25	P-typeATPse	GO:0016747 GO:0098655	Transporte transmembranar de cátions monoatômicos Atividade de aciltransferase
TR139179_c0_g1_i3	P-type ATPase	GO:0016747 GO:0098655	Transporte transmembranar de cátions monoatômicos Atividade de aciltransferase
TR101299_c1_g1_i8	P-type ATPase	GO:0016747 GO:0098655	Transporte transmembranar de cátions monoatômicos Atividade de aciltransferase
TR139179_c0_g1_i3	P-type ATPase	GO:0016747 GO:0098655	Transporte transmembranar de cátions monoatômicos Atividade de aciltransferase
TR139727_c1_g2_i2	P-type ATPase	GO:0016747 GO:0098655	Transporte transmembranar de cátions monoatômicos Atividade de aciltransferase
TR139513_c0_g2_i7	P-type ATPase	GO:0016747 GO:0098655	Transporte transmembranar de cátions monoatômicos Atividade de aciltransferase
TR139513_c0_g2_i5	P-type ATPase	GO:0016747 GO:0098655	Transporte transmembranar de cátions monoatômicos Atividade de aciltransferase
TR101933_c0_g1_i1	P-typeATPase	GO:0016747 GO:0098655	Transporte transmembranar de cátions monoatômicos Atividade de aciltransferase
TR217941_c0_g3_i3	P-type ATPase	GO:0016747 GO:0098655	Transporte transmembranar de cátions monoatômicos Atividade de aciltransferase
TR294842_c0_g2_i1	P-type ATPase	GO:0016747 GO:0098655	Transporte transmembranar de cátions monoatômicos Atividade de aciltransferase
TR139179_c0_g1_i3	P-type ATPase	GO:0016747 GO:0098655	Transporte transmembranar de cátions monoatômicos Atividade de aciltransferase

Fonte: O autor (2024).

5.3 Análise de ortologia com QTLs de soja associados à tolerância a estresse salino

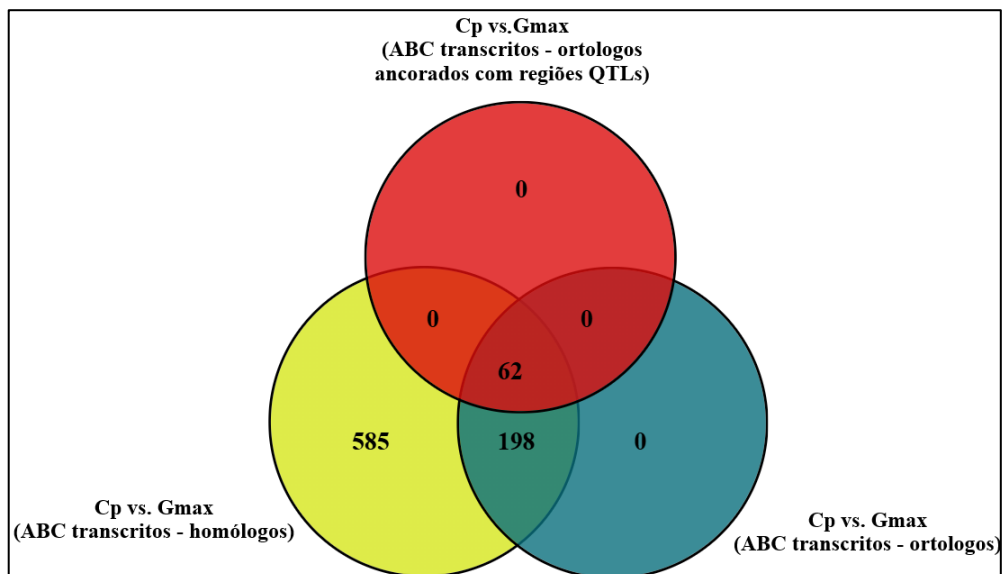
Foi realizada uma busca de sequências similares e ortólogas aos transcritos da Catingueira, codificadores das famílias gênicas de interesse, tanto contra o proteoma conceitual de soja, quanto contra o proteoma oriundo de regiões de QTLs de soja associadas à tolerância à estresse salino (Figura 4).

Figura 4 - Apresentação do quantitativo das famílias gênicas de interesse de Catingueira que apresentam ortologia com *loci* de soja ancorados, ou não, a regiões QTLs associados à tolerância a alta salinidade.



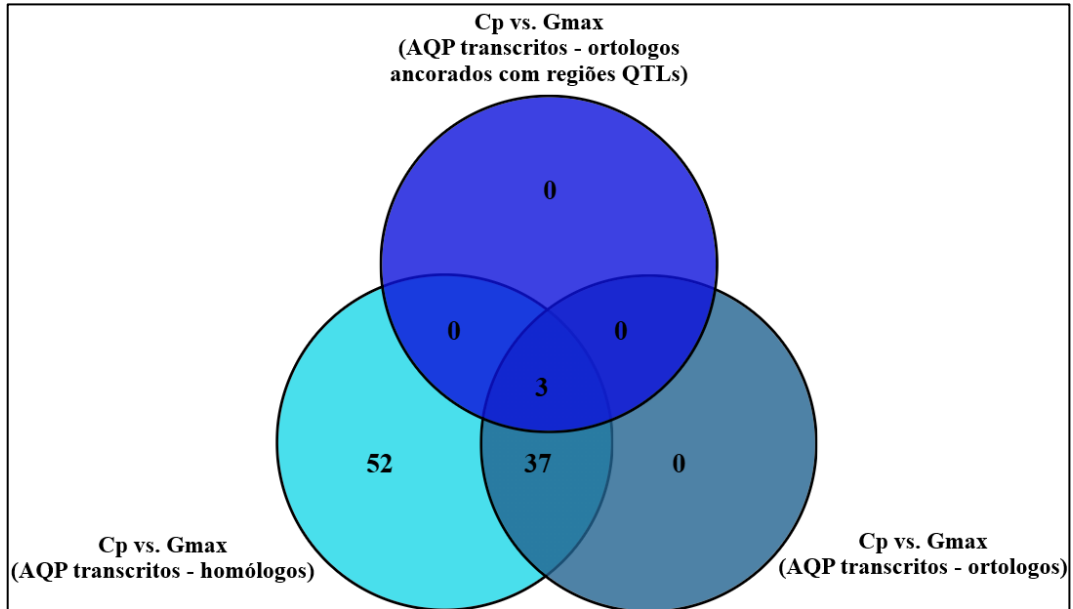
Fonte: O autor (2024).

Figura 5 - Apresentação do quantitativo dos transcritos da família gênica de *ABC transporters* de Catingueira que apresentam ortologia com *loci* de soja ancorados, ou não, a regiões QTLs associados à tolerância a alta salinidade.



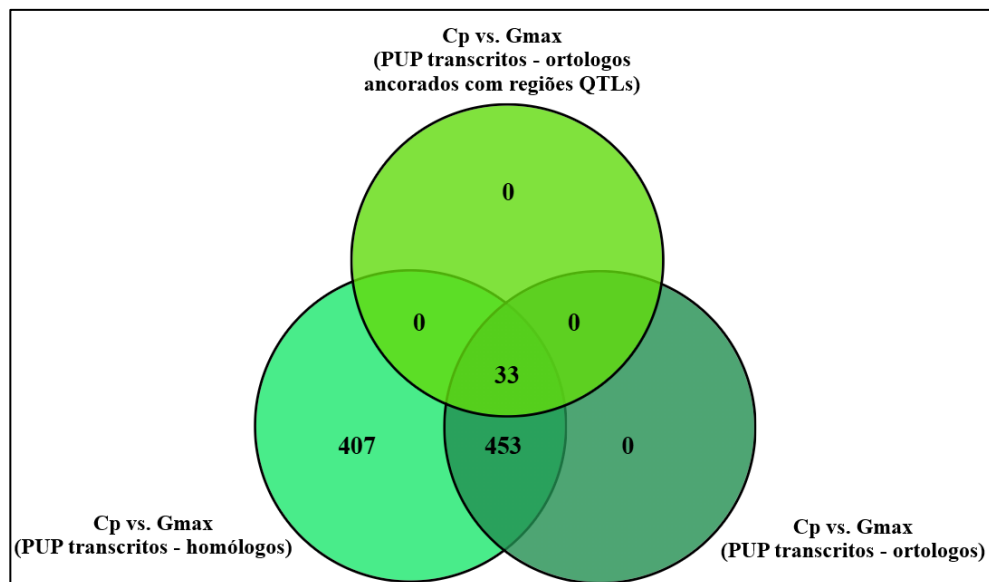
Fonte: O autor (2025).

Figura 6 - Apresentação do quantitativo dos transcritos da família gênica de Aquaporina de Catingueira que apresentam ortologia com *loci* de soja ancorados, ou não, a regiões QTLs associados à tolerância a alta salinidade.



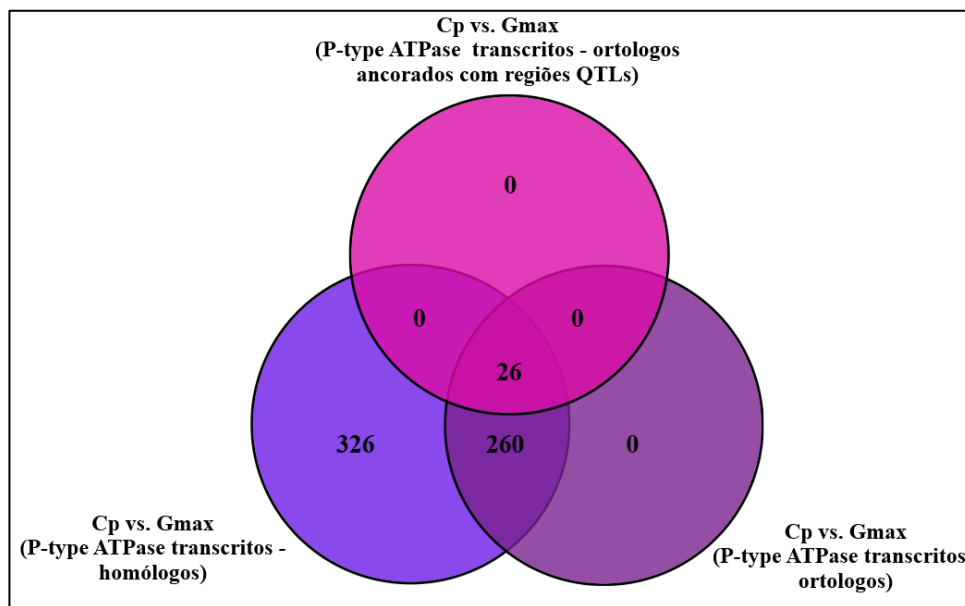
Fonte: O autor (2025)

Figura 7 - Apresentação do quantitativo dos transcritos da família gênica de *Purine permease* de Catingueira que apresentam ortologia com *loci* de soja ancorados, ou não, a regiões QTLs associados à tolerância a alta salinidade.



Fonte: O autor (2025).

Figura 8 - Apresentação do quantitativo dos transcritos da família gênica de *P-type ATPase* de Catingueira que apresentam ortologia com *loci* de soja ancorados, ou não, a regiões QTLs associados à tolerância a alta salinidade.



Fonte: O autor (2025).

Verificou-se que 585 *ABC transporters*, 52 Aquaporinas, 407 PUP e 326 *P-type ATPase* exibiram similaridade (análise BLASTp) com proteínas de soja, sendo que 198, para *ABC transporters*, 37 para Aquaporinas, 453 para PUP e 260 para *P-type ATPase* apresentaram relações de ortologia (Figura 4; Figura 5; Figura 6; Figura 7; Figura 8).

Em relação ao conjunto dos ortólogos, observou-se que 62 para *ABC transporters*, 3 para Aquaporinas, 33 para PUP e 26 para *P-type ATPase* foram ortólogos a proteínas codificadas nas regiões de QTLs analisadas (Figura 5; Figura 6; Figura 7; Figura 8). Nesse conjunto, 32 transcritos da Catingueira foram induzidos nas análises *in silico* de RNA-Seq, sendo 10 transcritos da família gênica *ABC transporters*, três Aquaporinas, 15 para a família PUP e quatro *P-type ATPase* (Figura 9).

Figura 9 - Identificação dos pares de ortólogos dos transcritos induzidos da Catingueira e soja ancorados nos QTLs de tolerância a salinidade.

Glycine max QTL ID	C. pyramidale transcript ID	Gene family	Soybean protein ID
Salt tolerance 1-g1	TR139250_c0_g1_i5	ABC	Glyma.08G101500.1.p
	TR138214_c0_g1_i2	ABC	
	TR32-775_c0_g1_i3	ABC	
	TR320322_c0_g1_i4	PUP	Glyma.08G099400.1.p
	TR294773_c2_g1_i1	PUP	
Salt tolerance 1-g2	TR178689_c1_g1_i1	PUP	Glyma.08G100800.1.p
	TR217113_c0_g1_i1	PUP	Glyma.08G100800.1.p
	TR139372_c3_g1_i3	PUP	Glyma.08G134600.1.p
	TR256293_c0_g1_i10	PUP	
	TR178095_c0_g1_i5	PUP	
Salt tolerance 1-g3	TR25154_c0_g1_i4	PUP	Glyma.08G124800.1.p
	TR102425_c1_g1_i3	ABC	Glyma.08G127000.1.p
	TR218007_c1_g1_i1	ABC	Glyma.06G189300.1.p
	TR63573_c0_g1_i1	ABC	Glyma.06G191400.1.p
	TR293392_c0_g1_i2	PUP	Glyma.06G191300.1.p
Salt tolerance 1-g4	TR25074_c0_g1_i4	AQPs	Glyma.06G189600.1.p
	TR254589_c0_g2_i19	PUP	Glyma.18G240700.1.p
Salt tolerance 1-g6	TR293042_c0_g4_i2	AQPs	Glyma.18G236800.1.p
	TR177995_c0_g3_i3	AQPs	
	TR177995_c0_g3_i1	ABC	
Salt tolerance 1-g8	TR320360_c1_g3_i1	ABC	Glyma.02G255000.1.p
	TR217432_c0_g1_i2	ABC	Glyma.02G261600.1.p
Salt tolerance 1-g9	TR139513_c0_g2_i7	PUP	Glyma.13G183400.1.p
	TR139513_c0_g2_i3	P-type ATPase	
	TR101933_c0_g1_i1	P-type ATPase	
	TR217941_c0_g3_i3	P-type ATPase	
	TR294842_c0_g1_i1	P-type ATPase	Glyma.13G183700.1.p
Salt tolerance 1-g10	TR63573_c0_g1_i1	ABC	
	TR175176_c0_g3_i1	PUP	Glyma.12G228500.1.p
	TR138708_c0_g1_i1	PUP	
	TR320457_c0_g1_i3	PUP	
Salt tolerance 1-g11	TR320261_c0_g1_i1	PUP	Glyma.12G224500.1.p
			Glyma.09G005500.1.p

Fonte: O autor (2024).

5.4 Transportadores de membrana induzidos (*up-regulated*)

Os dados de expressão gênica diferencial obtidos pela análise *in silico* de RNA-Seq, foram analisados via RT-qPCR. Foram testados 40 alvos, sendo 38 alvos das famílias gênicas estudadas e dois genes constitutivos (Tabela 2).

Tabela 2 – Sequência de *primers* dos genes de referência e alvos avaliados.

Primer	Família	Sequência (5' – 3')	T _m (°C)	GC (%)	Tamanho (pb)
Genes Referência					
SAC1		F:CCAGTCCAGGTCCTTCACATA R:TGAAGAGAATGGTTGGTACGG	60	52,4	108
HAG2		F:GCATGAGACGAGGAGAGTTTG R:CACTTCGCCTGCTTAATTTTG	60	52,4	101
Genes Alvos					
TR177995_c0_g3_i3	AQP	F: ACATGCCCTTCCGAAACATCGC R: CGTGGGTGAGTTTGTGAAGGC	62	54,5	150
TR139956_c0_g1_i1	AQP	F: ATAATCTCAACCGCTCCGCCTC R: TGTTC AAGTTCACCACCACCGC	62	54,5	144
TR293042_c0_g4_i2	AQP	F: AAACCCAGCAGTGACGTTTCG R: TCCCAGACACTGCATCACCATG	61	54,5	88
TR288127_c0_g2_i1	AQP	F: ATAGCCTGTGTTCTCTGGAGCC R: GTTCCCACTTCTCACTTCTCAGC	61	54,5	80
TR102112_c1_g2_i4	AQP	F: AGATCATCGGCACCTTCGTTCTC R: AACACGGGAACATGGGAGTCAC	62	54,5	88
TR102112_c1_g3_i2	AQP	F: ATCCTTGTTTACTGCACCGCCG R: TGTGCCACCATGTACAGGAACG	63	54,5	119
TR165616_c0_g3_i1	AQP	F: AACCCGCTCGTTTCATTTGG R: ATCAATCCAGCCAAGCCACCAC	61	54,5	104
TR138214_c0_g1_i2	ABC	F: TGGTGGTGGCGCATCGTTTATC R: AGACGCATAGAATCCGCCCTTG	62	54,5	128
TR25074_c0_g1_i4	ABC	F: AGGGCACAAAGATCGGCATTG R: GCTCAACCAGGCGAAACAAAGC	61	54,5	80
TR217432_c0_g1_i2	ABC	F: TTACACTGTGCTGCTCTGCCTG R: ACAATTGTGCAGCTCCGGGTTC	63	54,5	89
TR102425_c1_g1_i3	ABC	F: ACACTTGCATACCCACTGAGCC R: GTCACGCCATGCAACACAAGTG	63	54,5	142
TR139250_c0_g1_i5	ABC	F: ATGGGCGAAAGAGGGATGATGC R: AGAATCCCACATTTGCAGCCGG	63	54,5	87
TR320775_c0_g1_i3	ABC	F: TTCAATAGCCGCCGGTCTTTCC R: AATCGTTGACCTGGAGCAGCAG	63	54,5	112
TR255610_c0_g1_i2	ABC	F: TTTCCCGGCCCTCTTATCAACG R: ACGCCGCATTTGAACACCAG	62	54,5	111
TR218007_c1_g1_i1	ABC	F: TGTGCTTATGTTGTTGGGCGC R: TACGGCTGGCAAACACAAGC	62	55	80
TR320360_c1_g3_i1	ABC	F: TCACCACCAACCAAACCGTG R: TGTGGTGTGCTTGATGTGGAGC	62	54,5	130
TR63573_c0_g1_i1	ABC	F: AGCTCAACAGTGGATCCTTGCC R: TTCCACACCACAGAAGCTCCAG	62	54,5	88
TR25332_c1_g1_i2	ABC	F: TCACATCGCCTTCTCTGTCCTC R: ATATACTGCCCTGTGTGCCTCC	61	54,5	99
TR217351_c1_g1_i1	P-type ATPase	F: ATTGCGGAACAGGCTAAGCGTC R: AAGTGCCTCCAAGCTTGCCTTC	63	54,5	180

TR24680_c0_g2_i25	P-type ATPase	F: AAGAAACACGCGGGATTGGG R: ATTGCTCAGATATCACGCCCCG	62	54,5	100
TR217941_c0_g3_i3	P-type ATPase	F: TTTGCTGGATGGTTTGGGCG R: TGCAACCATCGAAACCTCCTCC	62	54,5	111
TR294842_c0_g2_i1	P-type ATPase	F: TCAGTTTAAGGCAGGCGAGACG R: AGGCACCGCAACCACTACAATG	63	54,5	97
TR139513_c0_g2_i7	P-type ATPase	F: TGGTCAGTTTGCAGCGACGTTC R: TGCCAGACTTTACAAGCGTCCC	63	54,5	91
TR139513_c0_g2_i5	P-type ATPase	F: TCGGGTGCAGCAAGAGACA R: TCGCTGCAAACCTGACCATCTGC	63	54,5	135
TR101933_c0_g1_i1	P-type ATPase	F: ACCCTCTTGTCTCTGGCTTCC R: AGTCCAAGCGTTCTCTGTCGTC	62	54,5	146
TR101299_c1_g1_i8	P-type ATPase	F: AGCGACGATGTTCCATGCACTG R: AACGCCCAACTACCGATCTCAC	63	54,5	113
TR139179_c0_g1_i3	P-type ATPase	F: TGTGTTGACGTTGACAGCGAGC R: ACAAGCACACACAAAGAGGGAGC	64	53	135
TR101055_c1_g1_i5	PUP	F: GCAGCCCATATTCAAGTCCG R: CTGCTCGGATTCAACGCTAC	59	55	178
TR102426_c1_g3_i1	PUP	F: CAAGCCGAACCCATATTCCG R: TCTTGAGGAAGTGAGCTGGG	59	55	170
TR294773_c2_g1_i1	PUP	F: TCTCGAAGGTCATGGAGTCG R: GAGAATAGCGGCGACAAGTC	59	55	178
TR255707_c0_g1_i4	PUP	F: AATTTCGCCTGCAAGTCCATC R: TCCACAATGTTGCGATGACC	58	50	115
TR256293_c0_g1_i10	PUP	F: TAAACCGTCTCATCCCACCC R: TTGTTTCGCTTGTGAGTTGG	59	55	180
TR254589_c0_g2_i19	PUP	F: TCGACACGTCCTATAGGGC R: TGAGGCAAAGAACCAAGCAC	59	55	179
TR217109_c0_g1_i4	PUP	F: GAGTCGAATTGTGAGGAGGC R: ACATCTTCTGCCCTCTCCAC	59	55	116
TR320630_c0_g1_i3	PUP	F: TCTCAGAGCATTCCTTCCG R: CCAACGCCATAGATCTTGCC	59	55	80
TR175176_c0_g3_i1	PUP	F: GCAGCACCCGAACCTAATGTC R: TGTCTCCTTGTGTTGACCAGC	59	55	134
TR254903_c0_g1_i2	PUP	F: AGCAACTGTACCATGACCATTG R: ATCCTTGCAAGTTTCTCGTGG	58	50	107
TR25154_c0_g1_i4	PUP	F: AAAGTTCACCCACGTCAAGC R: ATCCATCTATGCCTCCACCG	59	50	126

Fonte: O autor (2024).

Os transcritos avaliados por RT-qPCR (TR24680_c0_g2_i25/*P-type ATPase*, TR139513_c0_g2_i5/*P-type ATPase*, TR101933_c0_g1_i1/*P-type ATPase*, TR139956_c0_g1_i1/*Aquaporina*, TR217351_c1_g1/*P-type ATPase*, TR139179_c0_g1_i3/*P-type ATPase*, TR217109_c0_g1_i4/*Purine permease* e TR177995_c0_g3_i3/*Aquaporina*) revelaram indução no tratamento de 2 horas e 11 dias (Tabela 3), confirmando a modulação da expressão dos dados *in silico* obtidos nas bibliotecas RNA-Seq. Os parâmetros de qPCR que incluem eficiência de amplificação (E), declive (S) e coeficiente de correlação (R), derivados da curva padrão, foram obtidos a partir da diluição seriada das amostras de cDNA (Tabela 3).

Tabela 3 - Expressão relativa e parâmetros de qPCR [eficiência de amplificação (E), declive (S), coeficiente de correlação (R) e interceptação Y] derivados de transcritos codificadores de sistemas de transportadores de membrana em *C. pyramidale* sob estresse de alta salinidade. * MT: modulação transcricional.

Transcrito	Família	E (%)	R	S	Y Intercept	MT*
Estresse de 2 horas						
TR25074_c0_g1_i4	ABC	109,56	-0,993	-3,11	36,73	0,277(RE)
TR102425_c1_g1_i3	ABC	101,17	-0,982	-3,29	36,09	0,51(NS)
TR320360_c1_g3_i1	ABC	95,42	-0,917	-3,44	38,84	0,336(RE)
TR217351_c1_g1_i1	P-type ATPase	108,38	-0,989	-3,14	34,04	0,379(RE)
TR24680_c0_g2_i25	P-type ATPase	108,92	-0,991	-3,13	33,72	48,038(IN)
TR294842_c0_g2_i1	P-type ATPase	104,73	-0,995	-3,21	37,71	0,327(RE)
TR139513_c0_g2_i7	P-type ATPase	94,92	-0,995	-3,45	31,74	0,4(NS)
TR139513_c0_g2_i5	P-type ATPase	99,49	-0,960	-3,33	36,15	3,348(IN)
TR101933_c0_g1_i1	P-type ATPase	92,31	-0,983	-3,52	33,92	3,348(IN)
TR139179_c0_g1_i3	P-type ATPase	104,01	-0,984	-3,23	33,45	1,366(NS)
TR177995_c0_g3_i3	AQP	97,73	-0,708	-3,38	36,23	1,217(NS)
TR139956_c0_g1_i1	AQP	108,12	-0,997	-3,14	38,72	16,802(IN)
TR102112_c1_g2_i4	AQP	90,63	-0,999	-3,57	32,21	0,032(RE)
TR101055_c1_g1_i5	PUP	91,93	-0,992	-3,53	34,79	0,782(NS)
TR217109_c0_g1_i4	PUP	98,04	-0,988	-3,37	37,44	0,9804(NS)
SAC1	Gene de referência	101,14	-0,99	3,18	-	-
HAG2	Gene de referência	102,96	-0,99	3,25	-	-
Estresse de 11 dias						
TR25074_c0_g1_i4	ABC	109,56	-0,993	-3,11	36,73	0,507(RE)
TR102425_c1_g1_i3	ABC	101,17	-0,982	-3,29	36,09	0,626(RE)
TR320360_c1_g3_i1	ABC	95,42	-0,917	-3,44	38,84	0,059(RE)
TR217351_c1_g1_i1	P-type ATPase	108,38	-0,989	-3,14	34,04	6,855(IN)
TR24680_c0_g2_i25	P-type ATPase	108,92	-0,991	-3,13	33,72	1,134(NS)
TR294842_c0_g2_i1	P-type ATPase	104,73	-0,995	-3,21	37,71	0,613(NS)
TR139513_c0_g2_i7	P-type ATPase	94,92	-0,995	-3,45	31,74	1,433(NS)
TR139513_c0_g2_i5	P-type ATPase	99,49	-0,960	-3,33	36,15	0,831(NS)
TR101933_c0_g1_i1	P-type ATPase	92,31	-0,983	-3,52	33,92	2,738(IN)
TR139179_c0_g1_i3	P-type ATPase	104,01	-0,984	-3,23	33,45	4,236(IN)
TR177995_c0_g3_i3	AQP	97,73	-0,708	-3,38	36,23	5,100(IN)
TR139956_c0_g1_i1	AQP	108,12	-0,997	-3,14	38,72	1,066(NS)
TR102112_c1_g2_i4	AQP	90,63	-0,999	-3,57	32,21	1,024(NS)
TR101055_c1_g1_i5	PUP	91,93	-0,992	-3,53	34,79	0,557(NS)
TR217109_c0_g1_i4	PUP	98,04	-0,988	-3,37	37,44	2,738(IN)
SAC1	Gene de referência	101,14	-0,99	3,18	-	-
HAG2	Gene de referência	102,96	-0,99	3,25	-	-

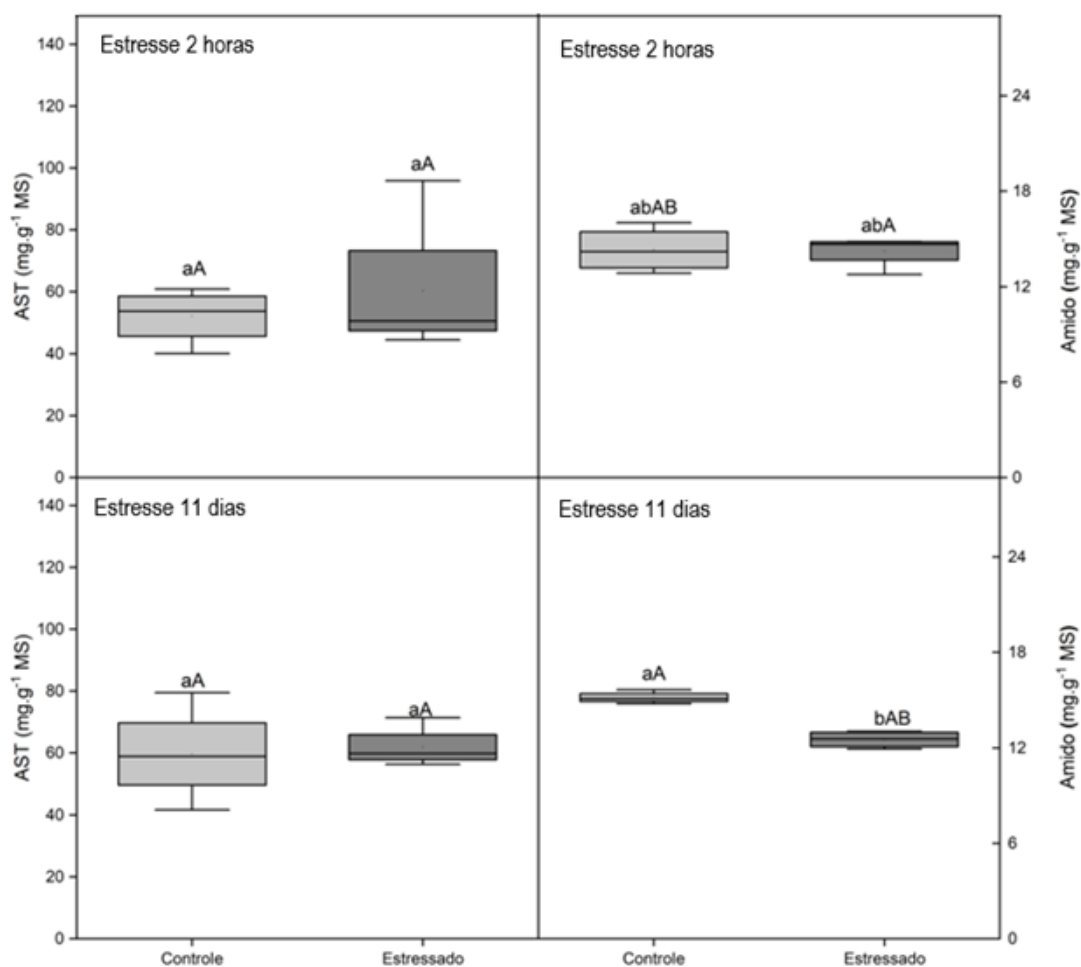
Fonte: O autor (2024). **Legenda:** NS (não significativo), RE (reprimido), IN (induzido).

5.5 Determinação de CNEs e amido na catingueira após 2h e 11 dias de estresse salino

Na análise dos carboidratos não estruturais (CNEs) foram avaliadas as variações nas concentrações de açúcares solúveis totais (AST) e amido, comparando os grupos controle e estressado ao longo dos diferentes períodos de estresse. Para os AST, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e estressado no mesmo tempo de estresse, nem entre diferentes tempos de estresse (Figura 10).

Em relação às concentrações de amido, os resultados também não mostraram diferença significativa entre os grupos estresse e controle após 2 horas sob estresse salino (Figura 10). No entanto, após 11 dias de estresse, o grupo controle apresentou uma concentração significativamente maior de amido em comparação com as amostras estressadas (Figura 10).

Figura 10 - Concentração de açúcares solúveis totais e amido nos tempos de estresse de 2 h e 11 dias.



Fonte: O autor (2024). **Legenda:** Açúcares solúveis totais (AST) e amido de raízes de plantas jovens de *Cenostigma pyramidale* sob estresse salino (estresse 2 horas, estresse 11 dias e seus respectivos controles). Os valores representam o valor médio para as repetições experimentais ($n = 5 \pm$ erro padrão), e letras maiúsculas representam diferença do tratamento ao dos diferentes períodos de estresse, letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos dentro do mesmo tempo de estresse, letras diferentes representam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

6.1 Transcritos diferencialmente expressos e termos GO associados

As análises *in silico* do perfil de transcrição das raízes da Catingueira sob estresse salino (100mM de NaCl) revelaram indução de 15 *ABC transporters* (Figura 2A), doze Aquaporinas (Figura 2B), 22 PUP (Figura 3A) e doze *P-type ATPase* (Figura 3B). Observou-se que, para todas as famílias gênicas, quanto maior o tempo de estresse aplicado, maior a quantidade de elementos reprimidos e induzidos.

A indução dos transcritos da família *ABC transporters* pode estar associada à translocação de sais e sódios nas células, pois seus genes estão associados com vias de sinalização ligadas ao estresse salino (BO *et al.*, 2019). Dessa forma, minimizando os impactos negativos da condição de estresse salino.

Em relação às Aquaporinas, o conjunto induzido, provavelmente, reflete a necessidade de maior absorção de água pelas raízes a fim de manter o equilíbrio hídrico/osmótico das células (COUCHOUD *et al.*, 2019). Adicionalmente, AQPs localizadas na membrana celular das raízes são capazes de translocar sais tóxicos para fora da célula e atuam como canais de cátion realizando a mobilização de Na⁺ e K⁺ (PATEL *et al.*, 2021; AHMED *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2021).

Os transcritos induzidos de *Purine Permease* provavelmente refletem a necessidade de aumentar o transporte de citocininas para que esse hormônio possa atuar de maneira mais eficaz contra os efeitos fisiológicos do estresse salino (ANFANG *et al.*, 2021). Isso ocorre ativando vias de sinalização de outros genes que ajudam na resistência ao estresse em questão e realizando sua influência metabólica no organismo para manter o equilíbrio iônico e osmótico (LÓPEZ *et al.*, 2019). Além disso, como as PUP têm a capacidade de realizar o transporte de íons contra seus gradientes de concentração, alguns transcritos induzidos podem estar agindo no sentido de diminuir a concentração de Na⁺ nas células.

Em relação ao conjunto de transcritos da família gênica *P-type ATPase*, sua indução deve estar associada à urgência em diminuir o sódio nas células ocasionado pelo estresse salino. Como as *P-type ATPase* são bombas de prótons transmembranares capazes de realizar o transporte de íons e cátions contra seus gradientes eletroquímicos (ZUBAREVA *et al.*, 2020), essas ATPases representam uma ótima opção para minimizar a concentração de Na⁺ intracelular e manter o equilíbrio iônico das células (JIA *et al.*, 2023). Além disso, existe uma correlação entre os transcritos dessa família gênica e o controle do estômato (ZHAO *et al.*, 2021). Dessa

forma, esses transcritos podem estar ativando mais de um mecanismo de defesa com a finalidade de aumentar a absorção de água, visando restaurar o equilíbrio hídrico das células.

Os dados obtidos da ferramenta *Gene Ontology* contribuem para a compreensão da natureza biológica dos transcritos em estudo. Os transcritos *ABC transporters* induzidos - associados a um termo GO - apresentaram a função de transporte transmembranar (Tabela 1), sugerindo seu papel na remobilização de sais na célula.

As Aquaporinas demonstram uma associação não apenas com o processo biológico anterior, mas também com aqueles que envolvem o transporte de água e fluidos (Tabela 1). Essa correlação ressalta sua função essencial em facilitar, de forma ágil, o transporte de moléculas de água. Isso é alcançado por meio da criação de canais nas áreas intracelulares e nas membranas celulares. Essa atividade é de suma importância para mitigar os efeitos prejudiciais do estresse salino, visto que promove uma condutância hidráulica estável, resultando na regulação adequada dos níveis osmóticos intracelulares (GAUTAM *et al.*, 2021).

Os transcritos *Purine Permease* induzidos estão associados a termos GO que demonstraram a função de autofosforilação de proteínas e transdução de sinal intracelular (Tabela 1), evidenciando seu papel na ativação das proteínas de transporte e remobilização de citocininas. Por outro lado, as *P-type ATPases* mostraram associação com processos biológicos de transporte transmembranar de cátions monoatômicos e, de forma surpreendente, com a atividade de acetiltransferase (Tabela 1). Dessa forma, as ATPases do tipo P exibem o efeito esperado de serem capazes de realizar a translocação de cátions como Na^+ para manter a homeostase iônica, sugerindo ainda a modificação de genes e possivelmente de proteínas associadas ao estresse salino devido à sua capacidade de transferir grupos acetil.

6.2 Ortólogos à QTLs de soja associados a tolerância a estresse salino

A identificação de genes localizados em regiões de QTLs revela seu importante papel em programas de melhoramento genético vegetal, visando a obtenção de cultivares agrícolas mais adaptadas ao estresse associado, promovendo a segurança alimentar e a sustentabilidade das culturas agrícolas. Neste estudo, 948 transcritos das famílias gênicas ABC, AQPs, PUP e *P-type ATPase* de *C. pyramidale* apresentaram relações de ortologia com proteínas de soja (Figura 4). Devido a esses dois organismos pertencerem à família (Fabaceae), essa relação evolutiva entre seus transcritos é coerente. Em uma conjunção mais particular, observou-se 32 transcritos induzidos (10 pertencentes a família gênica *ABC transporters*, três AQPs, 15 PUP e quatro *P-type ATPase*) na catingueira, ortólogos de proteínas codificadas em QTLs de soja

associadas à tolerância ao estresse salino (Figura 4). Isso significa a importância desses transcritos como alvos candidatos para análises de caracterização funcional na referida espécie e em outras leguminosas. Além disso, os transcritos de ambas as famílias gênicas estudadas apresentam a relação de ortologia do tipo "*many-to-one*" com os transcritos das QTLs Salt tolerance 1-g1, Salt tolerance 1-g2, Salt tolerance 1-g6, Salt tolerance 1-g9 e Salt tolerance 1-g10 (Figura 5). Esse tipo de relação ocorre quando múltiplos genes/proteínas de uma espécie são ortólogos de um único gene/proteína de outra espécie (FERNÁNDEZ *et al.*, 2020). Logo, os transcritos induzidos de ABC, AQPs, PUP e *P-type ATPase* demonstram suprir o organismo de um depósito molecular interessante para fortalecer a tolerância ao estresse salino.

6.3 Expressão diferencial dos transportadores de membrana

A técnica de RNA-seq é frequentemente empregada para explorar os padrões de expressão genética em plantas em resposta a uma variedade de fatores de estresse, abrangendo a salinidade e demais estresses abióticos. Aliado a esse método tem-se a RT-qPCR desempenhando um papel significativo na detecção e quantificação da expressão gênica, sendo uma ferramenta valiosa para análises transcriptômicas abrangendo uma variedade de organismos e condições de tratamento (POMBO *et al.*, 2019).

No presente estudo, a validação dos dados de expressão da biblioteca de RNA-Seq da Catingueira submetida à salinidade (NaCl 100 mM) foi parcialmente corroborada pelos dados obtidos por RT-qPCR, demonstrando conscientência entre as abordagens. Embora o número de genes regulados positivamente tenha sido menor do que as análises *in silico* previram, os dados confirmam tendências importantes na resposta da planta ao estresse salino.

Para o tratamento de duas horas, dos 38 transcritos selecionados (oito aquaporinas, dez *ABC transporter*, onze *Purine Permease* e nove *P-type ATPase*) para a validação, somente um transcrito da família Aquaporina (AQP2) e três da família *P-type ATPase* (ATPase2, ATPase6, ATPase7) apresentaram regulação positiva -induzido- (Tabela 3). No que diz respeito ao tratamento de onze dias, novamente um transcrito da família Aquaporina, embora tenha sido um transcrito diferente (AQP1), um da família *Purine Permease* (PUP7) e três *P-type ATPase* (ATPase1, ATPase7, ATPase9) demonstraram regulação positiva (Tabela 3).

Os resultados foram inesperados, visto que os transcritos das famílias gênicas *ABC transportes*, Aquaporinas, *Purine Permease* e *P-type ATPase* são responsivos ao estresse salino e foram induzidos nas análises RNA-Seq. Todas as famílias analisadas, com exceção das PUP, possuem a capacidade de transportar sais e sódio intracelulares, embora a principal função das

Aquaporinas seja o transporte de água. Esse transporte de água realizado pelas Aquaporinas é de suma importância para a homeostase do organismo frente ao estresse salino, uma vez que esse tipo de estresse é causador da seca fisiológica nas plantas. *ABC transporters*, por outro lado, desempenham um papel mais amplo no transporte de sais e sódio, além de estarem envolvidas em vias de sinalização específicas para esse tipo de estresse. No que se refere a família *P-type ATPase*, seus transcritos são responsáveis pela exclusão do Na^+ intracelular, quando esse estar em excesso, pois como são bombas de antiporter Na^+/H^+ possui a capacidade de translocar esse cátion contra seu gradiente de concentração contribuindo para a homeostase iônica e osmótico das células. Embora as *Purine Permeases* não estejam diretamente ligadas com a capacidade de remobilização de sais e sódios elas desempenham um importante papel para a tolerância ao estresse salino, pois os transcritos dessa família transportam o fitohormônio citocinina o qual além de contribuir para o crescimento e desenvolvimento das plantas ele atua mantendo o equilíbrio metabólico e iônico do organismo além de ativar vias de sinalização de genes associados ao estresse salino.

A análise de expressão gênica por meio de RNA-Seq e ensaios de RT-qPCR são ferramentas essenciais na pesquisa de transcriptômica, fornecendo informações valiosas sobre a regulação gênica em diferentes condições. Uma série de fatores técnicos e biológicos deve ser considerada ao abordar essa discrepância acima relatada. Primeiramente, variações no grau de sensibilidade e especificidade entre os dois tipos de análises, resultando em diferenças nos resultados obtidos pelas duas técnicas (VANGUILDER *et al.*, 2008; BUSTIN *et al.*, 2013). Além disso, considerando a natureza complexa e dinâmica da regulação gênica, é crucial reconhecer que as amostras biológicas podem apresentar variações intrínsecas, o que pode influenciar os resultados obtidos a partir de diferentes metodologias de análise. (MARIONI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009).

6.4 Dinâmica de carboidratos não estruturais

Durante o estresse salino, as plantas tendem a acumular carboidratos não estruturais (CNEs), especialmente em seus tecidos foliares e caulinares. Esse acúmulo ocorre devido às propriedades dos açúcares solúveis, que atuam na osmorregulação, como osmólitos e eliminadores de radicais hidroxila, ajudando a planta a manter seu equilíbrio hídrico e a resistir às condições impostas pelo estresse salino (PELLEGRINI *et al.*, 2020). Para aumentar os níveis de carboidratos não estruturais e promover seu acúmulo, a planta adota duas estratégias: o aumento da síntese desses compostos e sua realocação para os tecidos mais necessitados.

A região radicular das plantas já é conhecida por possuir vias de sinalização que são ativadas pelo aumento nos níveis de salinidade, desencadeando a estratégia de acumulação de açúcares solúveis (TATTINI *et al.*, 1996; SINGH *et al.*, 2022). Com base nos dados coletados sobre CNEs e amido no tecido radicular de *Cenostigma pyramidale*, é possível supor que a raiz desempenha um papel maior na acumulação desses carboidratos do que apenas a sinalização; ela pode ser responsável também pela produção e translocação desses compostos para outros tecidos.

Os dados que sustentam essa hipótese mostram que, nos dois tempos de estresse analisados, não houve mudanças significativas nos níveis de açúcares entre as amostras controle e estressadas. No entanto, o nível de amido na amostra estressada no tempo de 11 dias foi menor do que sua amostra controle. Estudos anteriores indicam que a degradação do amido para suprir os níveis de carboidratos solúveis totais é uma estratégia comum para lidar com o estresse salino (LIMA *et al.*, 2021). Portanto, pode-se inferir que a diminuição do amido na região radicular se deve à sua degradação para manutenção nas concentrações de carboidratos solúveis totais, e a constância dos CNEs nessa região pode levantar a suposição que eles estão sendo transportados para outros tecidos da planta. Todavia, se faz necessária novos estudos repetindo esse experimento com a adição da análise dos tecidos foliares e caulinares e outros tempos de estresse para se confirmar essa nova função incutida a região radicular.

7 CONCLUSÃO

Os transcritos das famílias gênicas *ABC transporters*, Aquaporinas, *P-type ATPase* e *Purine Permease* agem como transportadores intrínsecos à membrana sendo capazes de realizar a translocação de sais nas células e transporte de fitohormônio, além de estarem associados com vias de sinalização ligadas ao estresse salino.

As análises *in silico* realizadas, evidenciam a expressão diferencial dos transcritos das famílias gênicas estudadas quando submetidas ao estresse salino. Ademais, os transcritos induzidos em *C. pyramidale* estão associados a termos GO relacionados a processos biológicos de transporte transmembranar, transporte de água e transporte de fluidos, autofosforilação de proteínas, fosforilação de peptidil-serina, transdução de sinal intracelular, transporte transmembranar de cátions monoatômicos e atividade de aciltransferase. O conjunto de induzidos também se relaciona com regiões de QTLs associados à tolerância à salinidade em soja. No entanto, as análises de expressão por RT-qPCR não estão totalmente concordantes com os dados da biblioteca de RNA-Seq. Embora alguns transcritos tenham sido induzidos, conforme previsto pelos dados *in silico*, outros não apresentaram indução. Variação nos dados de indução pode ser explicada pela maior sensibilidade e precisão da técnica de RT-qPCR na quantificação dos níveis de expressão gênica, conforme indicado por estudos. Portanto, são necessários estudos adicionais para verificar se as famílias gênicas estudadas realmente apresentam uma resposta efetiva ao estresse salino em *C. pyramidale*.

Os dados de carboidratos não estruturais revelaram diferenças significativas nos níveis de amido entre as amostras estressada e controle para o tempo de estresse de 11 dias. A redução do amido da planta sob estresse (em comparação com a planta controle) pode ser resultado da degradação deste carboidrato para manter as concentrações de carboidratos solúveis totais, mitigando os efeitos negativos do estresse salino. No entanto, são necessários novos estudos que repitam esse experimento, adicionando a análise dos tecidos foliares e caulinares, além de considerar diferentes períodos de estresse.

8 BIBLIOGRAFIA

- AGHAEI, Keyvan; KOMATSU, Setsuko. Crop and medicinal plants proteomics in response to salt stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 8, 2013.
- AHMED, J.; MERCX, S.; BOUTRY, M.; CHAUMONT, F. Evolutionary and Predictive Functional Insights into the Aquaporin Gene Family in the Allotetraploid Plant *Nicotiana tabacum*. **Int. J. Mol. Sci**, v. 21, p. 4743, 2020.
- ALEKSANDER, Suzi A. et al. The gene ontology knowledgebase in 2023. **Genetics**, v. 224, n. 1, p. iyad031, 2023. AMIN, I., RASOOL, S., MIR, M.A., WANI, W., MASOODI, K.Z. AND AHMAD, P. Ion homeostasis for salinity tolerance in plants: a molecular approach. **Physiologia Plantarum**, v.171, p.578-594, 2021.
- ALI, Akhtar et al. HKT sodium and potassium transporters in *Arabidopsis thaliana* and related halophyte species. **Physiologia plantarum**, v. 171, n. 4, p. 546-558, 2021.
- ANIL, Veena S.; KRISHNAMURTHY, H.; MATHEW, M. K. Limiting cytosolic Na⁺ confers salt tolerance to rice cells in culture: a two-photon microscopy study of SBFI-loaded cells. **Physiologia Plantarum**, v. 129, n. 3, p. 607-621, 2007.
- ASHBURNER, M.; BALL, C.; BLAKE, J. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nat Genet**, v. 25, p. 25–29, 2000.
- ATHAR, Habib-ur-Rehman et al. Salt stress proteins in plants: An overview. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 999058, 2022.
- BANIK, Sanhita; DUTTA, Debajyoti. Membrane proteins in plant salinity stress perception, sensing, and response. **The Journal of Membrane Biology**, v. 256, n. 2, p. 109-124, 2023.
- BO, Wang et al. Targeted mutagenesis of NAC transcription factor gene, OsNAC041, leading to salt sensitivity in rice. **Rice Science**, v. 26, n. 2, p. 98-108, 2019.
- BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE Guidelines: M inimum I nformation for Publication of Q uantitative Real-Time PCR E xperiments. 2009.
- BUSTIN, Stephen A. et al. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. **Nature methods**, v. 10, n. 11, p. 1063-1067, 2013.
- BUTCHER, Kirsten et al. Soil salinity: A threat to global food security. **Agronomy Journal**, v. 108, n. 6, p. 2189-2200, 2016.
- BUTZ, Henriett; PATÓCS, Attila. Brief summary of the most important molecular genetic methods (PCR, qPCR, microarray, next-generation sequencing, etc.). **Genetics of Endocrine diseases and syndromes**, p. 33-52, 2019.
- CAMILO-ALVES, Constança SP et al. Chronic cork oak decline and water status: new insights. **New Forests**, v. 48, p. 753-772, 2017.
- CARVALHO FILHO, Rosembrando Sosthenes Leite et al. Caracterização histomorfológica e bioquímica de calos induzidos em *Cenostigma pyramidale* [Tul.] Gagnon & GP Lewis. **Ciência Florestal**, v. 33, n. 1, p. e66334, 2023.
- CHO, Young-Hee; YOO, Sang-Dong. Signaling role of fructose mediated by FINS1/FBP in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS genetics**, v. 7, n. 1, p. e1001263, 2011.
- CHOUDHURY, Feroza K. et al. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 856-867, 2017.

CORWIN, DENNIS L. Climate change impacts on soil salinity in agricultural areas. **European Journal of Soil Science**, v. 72.2, p. 842-862, 2021.

COSTA, Carlota et al. Comprehensive molecular screening: from the RT-PCR to the RNA-seq. **Translational lung cancer research**, v. 2, n. 2, p. 87, 2013.

COUCHOUD, M.; DER, C.; GIRODET, S. Drought stress stimulates endocytosis and modifies membrane lipid order of rhizodermal cells of *Medicago truncatula* in a genotype-dependent manner. **BMC Plant Biol** v.221, p. 19, 2019.

DAHUJA, A.; KUMAR, RR.; SAKHARE, A, et al. Role of ATP-binding cassette transporters in maintaining plant homeostasis under abiotic and biotic stresses. **Physiologia Plantarum**, v. 171, p. 785–801, 2021.

DE OLIVEIRA, José Miguel P. Ferreira et al. High-salinity activates photoprotective mechanisms in *Quercus suber* via accumulation of carbohydrates and involvement of non-enzymatic and enzymatic antioxidant pathways. **New Forests**, v. 53, n. 2, p. 285-300, 2022.

DO NASCIMENTO ACCIOLY, Aryane; DE PAIVA FARIAS, Rafael; DE ARRUDA, Emília Cristina Pereira. Plants in the caatinga possess multiple adaptative leaf morphoanatomical traits concurrently, a pattern revealed from a systematic review. **Journal of Arid Environments**, v. 222, p. 105162, 2024.

DU, YING; LU, RUILING; XIA, JIANYANG. Impacts of global environmental change drivers on non-structural carbohydrates in terrestrial plants. **Functional Ecology**, v. 34, n. 8, p. 1525-1536, 2020.

DUBOIS, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

E. PELLEGRINI, G. FORLANI, F. BOSCUCCI, V. CASOLO. Evidence of non-structural carbohydrates-mediated response to flooding and salinity in *Limonium narbonense* and *Salicornia fruticosa*. **Aquatic Botany**, v. 166, 2020.

E. PELLEGRINI, G. FORLANI, F. BOSCUCCI, V. CASOLO. Evidence of non-structural carbohydrates-mediated response to flooding and salinity in *Limonium narbonense* and *Salicornia fruticosa*. **Aquatic Botany**, v. 166, 2020.

EL OMARI, BOUCHRA. Accumulation versus storage of total non-structural carbohydrates in woody plants. **Trees**, p. 1-13, 2022.

EMMS DAVID M; KELLY STEVEN. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. **Genome Biology**, v. 20, 2019.

ESWAR, DEEPTHI; KARUPPUSAMY, RAJAN; CHELLAMUTHU, SELVI. Drivers of soil salinity and their correlation with climate change. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 50, p. 310-318, 2021.

FALCÃO, Hiram M. et al. Phenotypic plasticity and ecophysiological strategies in a tropical dry forest chronosequence: A study case with *Poincianella pyramidalis*. **Forest Ecology and Management**, v. 340, p. 62-69, 2015.

FERNÁNDEZ, Rosa; GABALDON, Toni; DESSIMOZ, Christophe. Orthology: definitions, prediction, and impact on species phylogeny inference. **Phylogenetics in the genomic era**, p. 2.4: 1--2.4: 14, 2020.

FROSI, Gabriella et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and foliar phosphorus inorganic supply alleviate salt stress effects in physiological attributes, but only arbuscular mycorrhizal fungi

increase biomass in woody species of a semiarid environment. **Tree physiology**, v. 38, n. 1, p. 25-36, 2018.

GANI, U.; VISHWAKARMA, R.A. & MISRA, P. Membrane transporters: the key drivers of transport of secondary metabolites in plants. **Plant Cell Rep**, v. 40, p. 1–18, 2021.

GARCIA-CAPARROS, Pedro; LAO, María Teresa. The effects of salt stress on ornamental plants and integrative cultivation practices. **Scientia horticulturae**, v. 240, p. 430-439, 2018.

GAUTAM, ARTI; PANDEY, AKHILESH KUMAR. Aquaporins responses under challenging environmental conditions and abiotic stress tolerance in plants. **The Botanical Review**, v. 87, n. 4, p. 467-495, 2021.

GAUTAM, Arti; PANDEY, Akhilesh Kumar. Aquaporins responses under challenging environmental conditions and abiotic stress tolerance in plants. **The Botanical Review**, v. 87, n. 4, p. 467-495, 2021.

GIL, Ricardo et al. Are soluble carbohydrates ecologically relevant for salt tolerance in halophytes?. **Functional Plant Biology**, v. 40, n. 9, p. 805-818, 2013.

GILL, Rafaqat Ali et al. The role of membrane transporters in plant growth and development, and abiotic stress tolerance. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, p. 12792, 2021.

GURMANI, A. R. et al. Alleviation of salt stress by seed treatment with abscisic acid (ABA), 6-benzylaminopurine (BA) and chlormequat chloride (CCC) optimizes ion and organic matter accumulation and increases yield of rice (*Oryza sativa* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 10, p. 1278-1285, 2011.

HAN, Yan et al. The major intrinsic protein family and their function under salt-stress in peanut. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 639585, 2021.

HARUTA, Miyoshi; GRAY, William M.; SUSSMAN, Michael R. Regulation of the plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) by phosphorylation. **Current opinion in plant biology**, v. 28, p. 68-75, 2015.

HRDLICKOVA, Radmila; TOLOUE, Masoud; TIAN, Bin. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 8, n. 1, p. e1364, 2017.

JANICKA-RUSSAK, Małgorzata. Plant plasma membrane H⁺-ATPase in adaptation of plants to abiotic stresses. **Abiotic stress response in plants-physiological, biochemical and genetic perspectives**, v. 1, p. 197-218, 2011.

JEFF GAUTHIER, ANTONY T VINCENT, STEVE J CHARETTE, NICOLAS DEROME. **Briefings in bioinformatics**, v. 20, n. 6, p. 1981-1996, 2019.

JIA, Bowei et al. The conserved evolution of plant H⁺-ATPase family and the involvement of soybean H⁺-ATPases in sodium bicarbonate stress responses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 204, p. 108133, 2023. BÜLENT OKUR, NESRİN ÖRÇEN. Chapter 12 - Soil salinization and climate change. **Elsevier**, p. 331-350, 2020.

JIA, J.; LIANG, Y.; GOU, T.; HU, Y.; ZHU, Y.; HUO, H.; GUO, J.; GONG, H. The expression response of plasma membrane aquaporins to salt stress in tomato plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 178, p. 104190, 2020.

JIAO, L.; ZHOU, Y.; LIU, X.; WANG, S.; LI, F. Driving Forces Analysis of Non-structural Carbohydrates for *Phragmites australis* in Different Habitats of Inland River Wetland. **Water**, v. 12, 2020.

- KEREPESI, Ildikó; GALIBA, Gabor. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. **Crop science**, v. 40, n. 2, p. 482-487, 2000.
- KESHISHIAN, Erika A. et al. CYTOKININ RESPONSE FACTOR 2 is involved in modulating the salt stress response. **The Plant Journal**, v. 110, n. 4, p. 1097-1110, 2022.
- KEUNEN, E. L. S. et al. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, cell & environment**, v. 36, n. 7, p. 1242-1255, 2013.
- KRISHNAMURTHY, Pannaga et al. The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). **Planta**, v. 230, p. 119-134, 2009.
- KUMARI, Jyoti; RATHORE, Mangal S. Na⁺/K⁺-ATPase a primary membrane transporter: an overview and recent advances with special reference to algae. **The Journal of membrane biology**, v. 253, n. 3, p. 191-204, 2020.
- LAÍS L. LIMA; GABRIELLA FROSI; RAFAELA LOPES; MAURO GUIDA SANTOS. Remobilization of leaf Na⁺ content and use of nonstructural carbohydrates vary depending on the time when salt stress begins in woody species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 158, p. 385-395, 2021.
- LI, Wei et al. Ectopic expression of a *Thellungiella salsuginea* aquaporin gene, TsPIP1; 1, increased the salt tolerance of rice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 8, p. 2229, 2018.
- LIU, CHANG-JUN; ZHAO, YUNJUN; ZHANG, KEWEI. Cytokinin transporters: multisite players in cytokinin homeostasis and signal distribution. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 693, 2019.
- MANSOUR, Mohamed Magdy F. The plasma membrane transport systems and adaptation to salinity. **Journal of plant physiology**, v. 171, n. 18, p. 1787-1800, 2014.
- MARIONI, John C. et al. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome research**, v. 18, n. 9, p. 1509-1517, 2008.
- MÁRQUEZ-LÓPEZ, R.E; QUINTANA-ESCOBAR, A.O; LOYOLA-VARGAS, V.M. Cytokinins, the Cinderella of plant growth regulators. **Phytochem**, v. 18, p. 1387-1408, 2019.
- MATALIN, D.A.; KHRAMOV, D.E.; SHUVALOV, A.V.; VOLKOV, V.S.; BALNOKIN, Y.V.; POPOVA, L.G. Cloning and Characterization of Two Putative P-Type ATPases from the Marine Microalga *Dunaliella maritima* Similar to Plant H⁺-ATPases and Their Gene Expression Analysis under Conditions of Hyperosmotic Salt Shock. **Plants**, v. 10, 2021.
- MAUREL, Christophe et al. Aquaporins in plants. **Physiological reviews**, v. 95, n. 4, p. 1321-1358, 2015.
- MISHRA, Gayatri; MOHAPATRA, Subrat Kumar; ROUT, Gyana Ranjan. Plant membrane transporters function under abiotic stresses: A review. **Planta**, v. 260, n. 6, p. 125, 2024.
- MISRA, BB, LANGEFELD, C., OLIVIER, M., COX, LA. Integrated omics: tools, advances and future approaches. **Journal of molecular endocrinology**, v. 62, n. 1, p. R21-R45, 2019.
- MORAN ANFANG; EILON SHANI. Transport mechanisms of plant hormones. **Plant Biology**, v. 63, 2021.
- NGUYEN, Van NT et al. OsABCG9 is an important ABC transporter of cuticular wax deposition in rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 960, 2018.

- OBATA, Toshihiro et al. Rice shaker potassium channel OsKAT1 confers tolerance to salinity stress on yeast and rice cells. **Plant physiology**, v. 144, n. 4, p. 1978-1985, 2007.
- OKON, O.G. Effect of Salinity on Physiological Processes in Plants. In: Giri, B., Varma, A. (eds) Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions. **Soil Biology**, v. 56, 2019.
- PABINGER, Stephan et al. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 1, n. 1, p. 23-33, 2014.
- PATEL, J.; MISHRA, A. Plant aquaporins alleviate drought tolerance in plants by modulating cellular biochemistry, root-architecture, and photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v. 172, p. 1030– 1044, 2021.
- POLASH, Mohammed Arif Sadik et al. Effect of salinity on osmolytes and relative water content of selected rice genotypes. **Trop. Plant Res**, v. 5, n. 2, p. 227-232, 2018.
- POLASH, Mohammed Arif Sadik; SAKIL, Md Arif; HOSSAIN, Md Alamgir. Plants responses and their physiological and biochemical defense mechanisms against salinity: A review. **Trop. Plant Res**, v. 6, n. 2, p. 250-274, 2019.
- POLLE, A.; CHEN, S. On the salty side of life: molecular, physiological and anatomical adaptation and acclimation of trees to extreme habitats. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, p. 1794-1816, 2014.
- POMBO, MA; RAMOS, RN; ZHENG, Y; FEI, Z; MARTIN, GB; ROSLI, HG. Transcriptome-based identification and validation of reference genes for plant-bacteria interaction studies using *Nicotiana benthamiana*. **Sci Rep**, v. 9, p.1632, 2019.
- QI, ZHUYUN; XIONG, LIZHONG. Characterization of a purine permease family gene Os PUP 7 involved in growth and development control in rice. **Journal of integrative plant biology**, v. 55, n. 11, p. 1119-1135, 2013.
- RAJ MUKHOPADHYAY, BINOY SARKAR, HANUMAN SAHAY JAT, PARBODH CHANDER SHARMA, NANTHI S. BOLAN. Soil salinity under climate change: Challenges for sustainable agriculture and food security. **Journal of Environmental Management**, v. 280, p. 111736, 2021.
- RIBEIRO, I. M. C., ARRUDA, E. C. P. D., OLIVEIRA, A. F. M. D., & ALMEIDA, J. S. D. PHYSICAL AND CHEMICAL DEFENSES OF *Cenostigma pyramidale* (FABACEAE): A PIONEER SPECIES IN SUCCESSIONAL CAATINGA AREAS. **Revista Caatinga**, v.34, 2021.
- ROBINSON, MD.; MCCARTHY, DJ.; SMYTH, GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, p. 139-40, 2010.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO, Alonso; RUBIO, Francisco. High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. **Journal of experimental botany**, v. 57, n. 5, p. 1149-1160, 2006.
- ROMANOV, GEORGY A.; SCHMÜLLING, THOMAS. Opening doors for cytokinin trafficking at the ER membrane. **Trends in Plant Science**, v. 26, n. 4, p. 305-308, 2021.
- SADE, Nir; MOSHELION, Menachem. Plant aquaporins and abiotic stress. **Plant Aquaporins: From Transport to Signaling**, p. 185-206, 2017.
- SAFDAR.; HAMNA & AMIN.; ANIQA & SHAFIQ.; YOUSUF & ALI.; ANUM & YASIN.; RABIA & SARWAR.; MUHAMMAD ISHTIAQ.; ABBAS SHOUKAT.; MAQSOOD UL

HUSSAN.; MUHAMMAD ISHTIAQ SARWAR. A review: Impact of salinity on plant growth. **Nature and Science**, v. 1, p. 34-40, 2019.

SANTOS, W. R.; SOUZA, M. A. G.; SOUZA, L. S. B.; ARAÚJO JÚNIOR, G. Do N. .; SOUZA, C. A. A. de .; JARDIM, A. M. da R. F. .; SILVA, T. G. F. da . Emergence and the initial form of seedlings of *Cenostigma pyramidale* (Fabaceae) under saline stress. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. e18910514870, 2021.

SHAHID, M.A.; SARKHOSH, A.; KHAN, N.; BALAL, R.M.; ALI, S.; ROSSI, L.; GÓMEZ, C.; MATTSON, N.; NASIM, W.; GARCIA-SANCHEZ, F. Insights into the Physiological and Biochemical Impacts of Salt Stress on Plant Growth and Development. **Agronomy**, v. 10, 2020.

SHENGHAO QIN, YIYANG LIU, YAN HAN, GUOXIN XU, SHUBO WAN, FENG CUI, GUOWEI LI. Aquaporins and their function in root water transport under salt stress conditions in *Eutrema salsugineum*. **Plant Science**, v. 287, p. 110199, 2019.

SHI, Huazhong et al. Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 81-85, 2003.

SHULTZ, JL.; KURUNAM, D.; SHOPINSKI, K.; IQBAL MJ.; KAZI, S.; ZOBRIST, K.; BASHIR, R.; YAEGASHI, S.; LAVU, N.; AFZAL, AJ.; YESUDAS, CR.; KASSEM, MA.; WU, C.; ZHANG, HB.; TOWN, CD.; MEKSEM, K.; LIGHTFOOT, DA. The Soybean Genome Database (SoyGD): a browser for display of duplicated.; polyploid.; regions and sequence tagged sites on the integrated physical and genetic maps of *Glycine max*. **Nucleic Acids Res**, v. 1, p. 34, 2006.

SINGH, Ajay. Soil salinity: A global threat to sustainable development. **Soil Use and Management**, v. 38, n. 1, p. 39-67, 2022.

SINGH, Pooja et al. Salt stress resilience in plants mediated through osmolyte accumulation and its crosstalk mechanism with phytohormones. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1006617, 2022.

SOLTABAYEVA A, ONGALTAY A, OMONDI JO, SRIVASTAVA S. Morphological, physiological and molecular markers for salt-stressed plants. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 243, 2021.

Tattini, M., Gucci, R., Romani, A., Baldi, A. and Everard, J.D. (1996), Changes in non-structural carbohydrates in olive (*Olea europaea*) leaves during root zone salinity stress. *Physiologia Plantarum*, 98: 117-124.

THALMANN, Matthias; SANTELIA, Diana. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. **New phytologist**, v. 214, n. 3, p. 943-951, 2017.

ULLAH, Abid et al. Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 33103-33118, 2018.

VAILATI-RIBONI, MARIO; PALOMBO, VALENTINO; LOOR, JUAN J. What are omics sciences?. **Periparturient diseases of dairy cows: a systems biology approach**, p. 1-7, 2017.

VANGUILDER, Heather D.; VRANA, Kent E.; FREEMAN, Willard M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, v. 44, n. 5, p. 619-626, 2008.

VILELA, Livia Maria Batista et al. *Cenostigma pyramidale*: ethnomedicinal properties and perspectives on a legume tree highly adapted to semiarid 'Caatinga' region. In: **Ethnopharmacology of Wild Plants**. CRC Press, 2021. p. 218-233.

- WANG, Meijuan et al. Overexpression of PeHA1 enhances hydrogen peroxide signaling in salt-stressed Arabidopsis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 71, p. 37-48, 2013.
- WANG, Zhong; GERSTEIN, Mark; SNYDER, Michael. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.
- WANI, S.H; KUMAR, V; KHARE, T. Engineering salinity tolerance in plants: progress and prospects. **Planta**, v. 76, 2020.
- XIAO Y; LIU D; ZHANG G; GAO S; LIU L; XU F; CHE R; WANG Y; TONG H; CHU C. Big Grain3, encoding a purine permease, regulates grain size via modulating cytokinin transport in rice. **J Integr Plant Biol**, v. 61, p. 581–597, 2019.
- XIAO, Yunhua et al. Endoplasmic reticulum-localized PURINE PERMEASE1 regulates plant height and grain weight by modulating cytokinin distribution in rice. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 618560, 2020.
- XIAO-FEN CHENG, HUI-HUI WU, YING-NING ZOU, QIANG-SHENG WU, KAMIL KUČA. Mycorrhizal response strategies of trifoliate orange under well-watered, salt stress, and waterlogging stress by regulating leaf aquaporin expression. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 162, p. 27-35, 2021.
- XU, Yi et al. A banana aquaporin gene, MaPIP1; 1, is involved in tolerance to drought and salt stresses. **BMC Plant Biology**, v. 14, p. 1-14, 2014.
- XU, Z.; MAROWA, P.; LIU, H.; DU, H.; ZHANG, C.; LI, Y. Genome-Wide Identification and Analysis of P-Type Plasma Membrane H⁺-ATPase Sub-Gene Family in Sunflower and the Role of *HHA4* and *HHA11* in the Development of Salt Stress Resistance. **Genes**, 2020, v. 11, 2020.
- YEPES-MOLINA, LUCÍA; BÁRZANA, GLORIA; CARVAJAL, MICAELA. Controversial regulation of gene expression and protein transduction of aquaporins under drought and salinity stress. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1662, 2020.
- ZHANG, Z.; TONG, T.; FANG, Y.; ZHENG, J.; ZHANG, X.; NIU, C.; LI, J.; ZHANG, X.; XUE, D. Genome-Wide Identification of Barley ABC Genes and Their Expression in Response to Abiotic Stress Treatment. **Plants**, v. 9, p. 1281, 2020.
- ZHAO, CHUNZHAO; ZHANG, HENG; SONG, CHUNPENG; ZHU, JIAN-KANG; SHABALA, SERGEY. Mechanisms of Plant Responses and Adaptation to Soil. **The Innovation**, 2020.
- ZIERVOGEL, Gina; ERICKSEN, Polly J. Adapting to climate change to sustain food security. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change**, v. 1, n. 4, p. 525-540, 2010.
- ZUBAREVA, V. M. et al. Rotary ion-translocating ATPases/ATP synthases: diversity, similarities, and differences. **Biochemistry (Moscow)**, v. 85, p. 1613-1630, 2020.