



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA



NATÁLIA MARIA CORTE REAL DE CASTRO

**ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS E ANÁLISE PROTEÔMICA DE
DIFERENTES GENÓTIPOS DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DA SALINIDADE**

RECIFE-PE

2018

NATÁLIA MARIA CORTE REAL DE CASTRO

**ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS E ANÁLISE PROTEÔMICA DE
DIFERENTES GENÓTIPOS DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DA SALINIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Botânica, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Botânica.

Orientador:
Marcelo Francisco Pompelli

Coorientador:
Tercilio Calsa Junior

RECIFE-PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

C355a Castro, Natália Maria Corte Real de
Aspectos ecofisiológicos e análise proteômica de diferentes
genótipos de *Jatropha curcas* em função da salinidade / Natália
Maria Corte Real de Castro. – 2018.
88 f.: il.

Orientador: Marcelo Francisco Pompelli.
Coorientador: Tercilio Calsa Junior.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Recife,
BR-PE, 2018.
Inclui referências.

1. Biodiesel 2. NaCl 3. Pinhão-manso 4. Tolerância 5. Trocas
gasosas 6. Gel 2D I. Pompelli, Marcelo Francisco, orient.
II. Calsa Junior, Tercilio, coorient. III. Título

CDD 581

NATÁLIA MARIA CORTE REAL DE CASTRO

**ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS E ANÁLISE PROTEÔMICA DE
DIFERENTES GENÓTIPOS DE *Jatropha curcas* EM FUNÇÃO DA SALINIDADE**

Tese de doutorado defendida e _____ em 22 de fevereiro de 2018.

Coorientador:

Dr. Tercilio Calsa Junior – Presidente/ UFPE

Banca examinadora:

Dra. Cláudia Ulisses de Carvalho Silva – Titular/ UFRPE

Dra. Katia Castanho Scortecci - Titular/ UFRN

Dra. Lilia Gomes Willadino - Titular/ UFRPE

Dra. Marcia Vanusa da Silva - Titular/ UFPE

Dr. Adauto Gomes Barbosa Neto – Suplente

Dra. Terezinha Rangel Camara – Suplente/ UFRPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À minha família por todo amor e apoio em todos os momentos;

Ao meu Magno pela cumplicidade e pelo melhor ombro, muito mais que amigo;

Ao prof. Marcelo Pompelli pelo exemplo mais marcante;

Ao prof. Dr. Tercilio pela coorientação, paciência, conselhos e acolhida no seu laboratório;

Aos membros da banca, por terem aceito o convite e pelas contribuições no trabalho;

Ao PPGGB, no nome da prof. Dra. Teresa, pelo amparo e cuidado na condução do doutorado;

Ao Prof. Dr. Edivan Rodrigues pela disponibilidade, atenção e confiança;

Aos Drs. Egídio e Benjamin, pela parceria e contribuição no trabalho;

À Leo, pela amizade sem preço e me manter segura entre o vão e a plataforma;

Aos amigos que fizeram parte do LEV, pela dedicação com que me ajudaram nesse trabalho;

À Quisedec, por ter me ensinado tanto, e ter me feito mudar de ideia tantas vezes;

À Elton, pelas inúmeras companhias e risadas;

Aos colegas do LGPP por ter me acolhido e compartilhado bons momentos;

Aos amigos do meu eterno LCTV, por terem ensinado o que é ciência, amizade e respeito;

À FACEPE pela concessão da bolsa de estudos;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

Ao CETENE pela infraestrutura viabilizada para o trabalho;

À Universidade Federal de Pernambuco pelo espaço concedido;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Meu muitíssimo obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	10
REVISÃO DE LITERATURA	11
1. Histórico do biodiesel	11
2. <i>Jatropha curcas</i> L.	13
3. Salinidade do solo	15
3.1. Estratégias de tolerância ao estresse salino	16
4. Análise proteômica	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
ARTIGO I	
Resumo	29
1. Introdução	30
2. Material e Métodos	32
2.1. Material vegetal e condições de crescimento	32
2.2. Medidas de trocas gasosas	33
2.3. Medidas de fluorescência da clorofila a	34
2.4. Potencial osmótico foliar no amanhecer (Ψ_s)	34
2.5. Nutrientes foliares	35
2.6. Análises estatísticas	35
3. Resultados	36
4. Discussão	45
Agradecimentos	52
Referências	53
Material Suplementar	58
ARTIGO II	
Resumo	60
1. Introdução	61
2. Material e Métodos	63
2.1. Material vegetal e condições de crescimento	63
2.2. Tratamento salino	64
2.3. Extração de proteínas e quantificação	65
2.4. Análise de proteínas por eletroforese bidimensional	65
2.5. Aquisição e análise das imagens	66
2.6. Digestão com tripsina e espectrometria de massas	66
2.7. Identificação presumível e Análise bioinformática	66
3. Resultados	68
4. Discussão	75
5. Considerações	82
Referências Bibliográficas	82
Material suplementar	86
CONSIDERAÇÕES FINAIS	87

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1. Centro de origem e distribuição de *Jatropha curcas* L. no mundo. Adaptado de Silitonga *et al.* (2013) _____ 14

Artigo I

Figura 1. Taxa líquida de assimilação de CO₂ (A) de seis genótipos de *Jatropha curcas* em resposta a diferentes concentrações salinas (0, 250, 500 e 750 mM). Os valores são médias (n = 70) com erro padrão. _____ 37

Figura 2. Déficit de pressão de vapor (DPV) ao longo do experimento em diferentes blocos. Os valores são médias (n = 4) com erro padrão. _____ 37

Figura 3. Taxa líquida de assimilação de CO₂ (A) (A e B), condutância estomática (g_s) (C e D) e razão entre a concentração externa e interna de CO₂ na câmara subestomática (C_i/C_a) (E e F) de plantas jovens de seis genótipos de *Jatropha curcas* sem condição salina (A, C e E) e submetido à 750 mM NaCl (B, D e F). Horas: 0, momento anterior à aplicação do sal; 48 horas, máximo estresse (linha pontilhada vertical); 74 à 914, último dia de recuperação. Genótipo CNPAE112 representado pela cor azul, CNPAE114 cor vermelha, JCAL171 verde, CNPAE183 roxo, CNPAE218 amarelo e CNPAE304 preto. Os valores são médias (n = 4) com erro padrão. _____ 39

Figura Suplementar

Figura S1. Aspecto dos caules de plantas jovens de *Jatropha curcas* genótipo CNPAE112 (A) e CNPAE218 (B) submetidos à 750 mM de NaCl, ao final da recuperação, evidenciando necrose na base do órgão (seta), caracterizado pelo murchamento do tecido e coloração marrom. Fonte: Elaborada pelo autor. _____ 58

Artigo II

Figura 1. Gel 2D-PAGE do perfil proteômico foliar de *Jatropha curcas*, genótipo CNPAE183 (A) e genótipo CNPAE218 (B) submetidos ao estresse salino com 750 mM de NaCl. _____ 68

Figura 2. Ontologia gênica das DAPs de folhas de dois genótipos de *Jatropha curcas* submetidos a 750 mM de NaCl. _____ 74

Figura Suplementar

Figura S1. Modelo proposto para vias de modulação da regulação gênica da resposta ao estresse de dois genótipos de *J. curcas* em resposta a 48 horas submetido à 750 mM de NaCl. _____ 86

LISTA DE TABELAS

Artigo I

- Tabela 1. Procedência e localização geográfica da origem dos seis genótipos de *Jatropha curcas* selecionados. _____ 32
- Tabela 2. Nível de significância das variáveis estudadas, considerando o efeito isolado dos fatores bloco, genótipo (A), salinidade (B) e a interação (A x B) no máximo estresse (ME) e recuperação (RE). _____ 38
- Tabela 3. Parâmetros da fluorescência da clorofila a de seis genótipos de *J. curcas* submetidos a 750 mM (estresse) e sem sal (controle) na fase de máximo estresse (ME) e recuperação (RE). _____ 42
- Tabela 4. Variáveis nutricionais de seis genótipos de *J. curcas* submetido à 750 mM NaCl no máximo estresse (ME) e ao final da recuperação (RE), independente do tratamento salino. _____ 44
- Tabela 5. Potencial osmótico e variáveis nutricionais de plantas jovens de *J. curcas* submetidas à 750 mM NaCl (estresse) e sem adição de sal (controle) no máximo estresse, independente do genótipo. _____ 45

Artigo II

- Tabela 1. Localização de origem dos seis genótipos de *Jatropha curcas* selecionados. 63
- Tabela 2. Identificação de proteínas de *Jatropha curcas*, genótipos CNPAE183 submetidos a 750 mM de NaCl, usando o genótipo CNPAE218 como referência. Anotação presumível a partir dos espectros PMF/MALDI-ToF. _____ 69
- Tabela 3. Identificação de proteínas de *Jatropha curcas*, genótipos CNPAE218 submetidos a 750 mM de NaCl na condição de máximo estresse, usando o genótipo CNPAE183 como referência. Anotação putativa a partir de MALDI-ToF e analisada via PMF na plataforma Mascot. _____ 72
- Tabela 4. Principais processos biológicos significativamente enriquecidos no genótipo CNPAE183 de *J. curcas* comparado à espécie modelo *Arabidopsis thaliana*. _____ 75

Castro, Natália Maria Corte Real de, Dr. Universidade Federal Rural de Pernambuco, fevereiro de 2018. Aspectos ecofisiológicos e análise proteômica de diferentes genótipos de *Jatropha curcas* em função da salinidade. Dr. Marcelo Francisco Pompelli (orientador); Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior (coorientador).

RESUMO

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é uma oleaginosa de importância econômica atrelada à sua capacidade de geração de óleo para as indústrias de biodiesel. *J. curcas* ainda se destaca pela sua fácil adaptação às vastas condições edafoclimáticas, mesmo em regiões áridas e semiáridas. Neste cenário, se faz necessário a compreensão das respostas fisiológicas e moleculares de diferentes genótipos da espécie sob estresse abiótico. Sendo assim, objetivou-se estudar possíveis alterações ecofisiológicas, nutricionais e moleculares em diferentes genótipos de *J. curcas* submetidos ao estresse salino. Para isso, foram selecionados seis genótipos de pinhão-mansão, os quais receberam diferentes concentrações de sal, respectivas a cada tratamento salino (0, 250, 500 e 750 mM de NaCl) por 48 horas, seguida de lavagem do substrato para remoção do NaCl do sistema para promover recuperação das plantas por 35 dias. A fim de determinar o acúmulo diferencial de proteínas relacionadas às respostas à salinidade, foram selecionados, com base nos dados ecofisiológicos, dois genótipos com respostas mais contrastantes, sendo um com características de tolerante e outro de maior sensibilidade. Com relação as plantas submetidas ao tratamento mais severo, foi possível notar que os genótipos CNPAE112, CNPAE114 e CNPAE183 apresentam uma rápida recuperação das taxas fotossintéticas após atingirem o máximo estresse, bem como menores danos ao aparato fotossintético, diferente de CNPAE218 e CNPAE304, os quais não apresentaram recuperação completa. Os genótipos CNPAE112 e JCAL171 revelaram um maior desbalanço metabólico, quando comparado ao CNPAE183, que apresentou maior eficiência metabólica. Diante disso, analisando conjuntamente os dados obtidos, verificou-se que os genótipos CNPAE112, CNPAE114 e CNPAE183 apresentaram maior tolerância ao estresse salino, enquanto os CNPAE218 e CNPAE304 se mostraram mais sensíveis. O genótipo JCAL171 apresentou uma tolerância moderada, quando comparada aos outros genótipos. Sob estresse salino, o genótipo mais tolerante (CNPAE183) apresentou o acúmulo de proteínas de diferentes vias importante para a resposta à salinidade, incluindo produção de proteínas envolvidas na sinalização, metabolismo antioxidativo, como catalase, bem como enzimas importantes de diferentes vias energéticas e metabólicas, como fotossíntese e glicólise, garantindo sua eficiência e desenvolvimento. Dessa forma, os resultados revelam que a ativação das respostas biológicas da espécie em condição salina são genótipo dependentes.

Palavras-chave: Biodiesel; NaCl; Pinhão-mansão; Tolerância; Trocas gasosas; Gel 2D

Castro, Natália Maria Corte Real de, PhD. Universidade Federal Rural de Pernambuco, fevereiro de 2018. Ecophysiological aspects and proteomic analysis of different genotypes of *Jatropha curcas* as a function of salinity. Dr. Marcelo Francisco Pompelli (advisor); Dr. Tercilio Calsa Junior (Co-advisor).

ABSTRACT

Physic nut (*Jatropha curcas* L.) is an oleaginous plant economically important, mainly due to the high capacity of oil production for the biodiesel industries. In addition, this species stands out for its high adaptation to the different edaphoclimatic conditions, including in arid and semi-arid regions, where it occurs shortage of water and high salinity in the soil, conditions that cause damages, to the cultivated plants, resulting crop yield losses. Therefore, it is necessary to understand the physiological and molecular responses of different genotypes of *J. curcas* under salt condition. Thus, the aim of this work was to study the ecophysiological, nutritional and molecular responses in different genotypes of *J. curcas* submitted to saline stress. 90 days old plants of six genotypes of physic nut received different concentrations of salt (0, 250, 500 and 750 mM NaCl) for 48 hours. Right after, the NaCl was removed from the substrate for complete recovery of the plants. Regarding the plants submitted to 750 mM NaCl, it was possible to notice that the genotypes CNPAE112, CNPAE114 and CNPAE183 showed a rapid recovery of the photosynthetic rates after reaching the maximum stress, as well as less damages to the photosynthetic apparatus. Genotypes CNPAE218 and CNPAE304 had no complete recovery even after 35 days. Genotypes CNPAE112 and JCAL171 showed greater metabolic imbalance than CNPAE183, which showed higher metabolic efficiency. Therefore, CNPAE112, CNPAE114 and CNPAE183 genotypes showed higher tolerance to salt stress, whereas CNPAE218 and CNPAE304 were the more sensitive ones. The genotype JCAL171 had a moderate tolerance than other ones. In order to determine the differential accumulation of proteins related to salinity responses, the most sensitive (CNPAE218) and tolerant genotypes (CNPAE183) were selected for analysis. Under salt stress, the tolerant genotype showed proteins of energetic, metabolic and antioxidant pathways that ensure the successful development of this genotype. Thus, the results indicate that the activation of the biological responses in saline condition is closely related to the genotype.

Keywords: Biodiesel; NaCl; Physic nut; Tolerance; Gas Exchange; 2D PAGE

INTRODUÇÃO

A salinidade tem sido relatada como um dos estresses ambientais mais severos e limitantes para o cultivo em larga escala (Roy *et al.*, 2014), afetando mais de 20% das áreas cultivadas do mundo (Gupta e Huang, 2014), fato que pode ser agravado devido ao aquecimento global e práticas inadequadas de técnicas de irrigação (Ladeiro, 2012). No Brasil, essa problematização ocorre principalmente na região árida e semiárida nordestina devido às suas condições ambientais extremas, caracterizado, principalmente, pelo baixo índice pluviométrico e elevada demanda evaporativa.

Assim como o estresse hídrico, o sal interfere na fisiologia e no metabolismo dos vegetais (Slama *et al.*, 2015), uma vez que a salinidade é frequentemente acompanhada por déficit hídrico. O aumento da salinidade no solo diminui o potencial osmótico da solução de solo e dificulta a absorção de água pelas raízes, o que leva ao fechamento estomático, com consequente redução na captação de CO₂, elevação da razão O₂/CO₂ nos cloroplastos e uma diminuição das taxas de fotossíntese, favorecendo a fotorrespiração (Noctor *et al.*, 2002). Além disso, ao mesmo tempo em que há uma redução na absorção de água, a presença de íons de Na⁺ e Cl⁻ podem se acumular nas folhas, promovendo um efeito citotóxico, afetando os processos fisiológicos das plantas (Gupta e Huang, 2014). Ademais, estes sais podem inibir atividade enzimática em vias metabólicas importantes (Foyer e Shigeoka, 2011) diminuindo a eficiência do uso do carbono, e degradando proteínas e estruturas da membrana (Flagella *et al.*, 2004; Garg e Singla, 2004; Gupta e Huang, 2014). Todos esses danos culminam, a longo prazo, na diminuição de biomassa e produção vegetal (Roy *et al.*, 2014).

Diante dessa problemática, os constantes estudos e pesquisas são indispensáveis para a compreensão dos mecanismos de sobrevivência das plantas à salinidade. Nesse sentido, há uma crescente demanda por espécies com impacto econômico e tolerantes a ambientes salinizados, uma vez que as projeções futuras sobre alterações climáticas e aumento da população mundial também sugerem aumento da extensão da área afetada pela salinidade (Allbed e Kumar, 2013). Nesse cenário, espécies oleaginosas como o pinhão-manso (*Jatropha curcas*) despertam grande interesse, atribuído principalmente pela produção e ampla utilização comercial do seu óleo, indicado desde o setor farmacêutico e cosmético até a indústria de biodiesel (Pandey *et al.*, 2012).

O pinhão-manso se encontra amplamente distribuído em diversas condições edafoclimáticas, inclusive em regiões áridas e semiáridas, as quais poucas espécies cultiváveis toleram (Putten *et al.*, 2010). Diversos estudos têm sido desenvolvidos com *J. curcas*, inclusive estudos abordando salinidade, como os trabalhos de Silva *et al.* (2010), Campos *et al.* (2012) e

Silva *et al.* (2015). Porém, não há consenso sobre a tolerância dessa espécie ao estresse salino. Além da espécie, outros fatores são responsáveis por promover diferentes respostas vegetais frente a condição estressante, como a duração e intensidade do estresse, bem como fatores intrínsecos da planta como idade e variedade ou genótipo (Munns, 2011).

Neste contexto, a investigação fisiológica e molecular de diferentes genótipos de *J. curcas* se mostra importante para a exploração do potencial da biomassa atribuído a essa espécie, bem como a compreensão dos mecanismos de ativação das diferentes rotas de respostas de aclimatização às novas condições impostas, auxiliando assim no processo de seleção de genótipos elite, de modo a servir como importante ferramenta no melhoramento genético da espécie. Sendo assim, esse estudo buscou testar as seguintes hipóteses: *i*) os diferentes genótipos de *J. curcas* apresentam diferentes mecanismos de tolerância ao estresse salino, tanto no que tange as alterações nas trocas gasosas quanto balanço nutricional e *ii*) alterações no perfil proteômico refletem a condição de tolerância e sensibilidade do genótipo da espécie.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Histórico do biodiesel

A queima de combustíveis fósseis, principal fonte de energia na atualidade, provoca a liberação de gases, como o dióxido de carbono (CO₂) e o dióxido de enxofre (SO₂) na atmosfera (Marengo *et al.*, 2012). O acúmulo destes gases favorece diretamente o aumento da temperatura global média, afetando fortemente a amplitude e a distribuição das chuvas, assim como a elevação dos níveis oceânicos, em decorrência do derretimento das calotas polares e o aumento na frequência e intensidade de fenômenos climáticos extremos (Marengo *et al.*, 2012; Shahbaz e Ashraf, 2013).

Diante disso, se faz cada vez mais necessário o investimento em uma nova matriz energética, com fontes de energia limpa e renovável. Dentre estas fontes, destaca-se os biocombustíveis, objeto de pesquisas em muitos países do mundo. Dentre os principais biocombustíveis destacam-se o biogás, bioetanol, biometanol, bio-hidrogênio e o biodiesel (Escobar *et al.*, 2009; Lindfeldt e Westermarck, 2009; Fontes e Fontes, 2010). Esse último é um combustível biodegradável, que apresenta algumas características peculiares como: *(i)* é virtualmente livre de enxofre e compostos aromáticos, *(ii)* apresenta um alto teor de cetanos, *(iii)* possui aproximadamente 11% de oxigênio (O₂), *(iv)* possui maior viscosidade e maior ponto de fulgor que o diesel comercial, *(v)* tem um nicho de mercado específico diretamente associado às atividades agrícolas; *(vi)* tem preço de mercado relativamente superior ao diesel comercial (Ramos, 1999). Porém, com o incentivo e avanços nas pesquisas

para o aproveitamento dos subprodutos, como a glicerina e a torta residual da extração do óleo (Arroyo *et al.*, 2014), a produção de biodiesel pode ser obtida a um preço menor e mais competitivo do que o óleo diesel convencional (Parente, 2003).

No Brasil, as pesquisas com combustíveis alternativos tiveram início por volta da década de 1920, com a criação do Instituto Nacional de Tecnologia (INT), o qual visou o desenvolvimento sustentável do Brasil, através da pesquisa tecnológica e estímulo da inovação (Brasil, 1985). Contudo, a produção e o uso de biocombustíveis no Brasil só tiveram início na década de 1970 com o Programa Nacional do Álcool (Pró-álcool), o qual visava a substituição, em larga escala, dos derivados de petróleo. Porém, somente cinco anos mais tarde, com o Pró-óleo (Plano de produção de óleos vegetais para fins energéticos), a produção de biodiesel passou a ganhar destaque como uma fonte alternativa de energia (Farias, 2012). Posteriormente, só no século XXI, o Brasil cria o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), o qual estabeleceu a obrigatoriedade da mistura de pelo menos 2% de biodiesel ao diesel convencional, em todo país, a partir de 2008. Essa mistura geraria uma demanda anual de dois bilhões de litros de biodiesel a serem produzidas a partir daquele ano (Sebrae, 2010). Além do acréscimo da produção de biocombustível, esse programa também estimularia pequenos produtores rurais, concedendo redução de tributos federais para indústrias que utilizassem matérias-primas destes produtores (Duarte, 2008). Esses investimentos foram sentidos prontamente quando o Brasil, em 2010, foi elevado ao posto de segundo maior produtor de biodiesel do mundo (Brasil, 2011), ficando atrás apenas da Alemanha. Atualmente, a produção e uso de biodiesel vem sendo encorajados por ecologistas e empresas de todo o mundo; de forma que o Brasil tem se tornado uma importante potência na produção do biodiesel, principalmente por sua vantagem de liderança na geração de bioenergia (Fontes e Fontes, 2010).

No mercado de utilização do biodiesel, o óleo de espécies vegetais já tem sido muito apreciado pela aviação civil, a qual é utilizada no setor desde 2008, pela empresa *Air New Zealand*, que substituiu metade do combustível de aviação tradicional pela opção ecológica, obtendo-se uma mistura com resultados muito promissores. A partir desse momento, outras companhias aéreas anunciaram a incorporação do biodiesel ao combustível convencional em suas aeronaves, chegando a testar uma mistura de 70% de óleo de origem vegetal com 30% de origem fóssil. De acordo com a *European Aviation Safety Agency* o plantio de espécie produtora para suprir a demanda por biodiesel na aviação, poderia levar a uma absorção anual de cerca de 1.394 toneladas de carbono por hectare (Torres *et al.*, 2011; Van Rooijen, 2014), reduzindo em até 80% as emissões de carbono, se comparado ao querosene atualmente utilizado na aviação. Segundo a agência supracitada, essa meta deve ser atingida até 2050, com expectativas de antecipação para 2030 (Airbus, 2016).

Nos últimos anos, cerca de 80% da produção de biodiesel no Brasil vem da soja (Brasil, 2016), um vegetal que apresenta destinos diversos, especialmente ligados à alimentação animal e humana, com fortes impactos sobre a balança comercial dos países produtores (Acikgoz *et al.*, 2009). Nesse contexto, algumas plantas oleaginosas vêm se destacando com grande potencial para a produção de biodiesel, inclusive por não ser utilizado para a alimentação humana. Dentre essas, encontra-se o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) (Pompelli *et al.*, 2011; Kumar, 2012; Singh, Singh, Rao, *et al.*, 2013).

2. *Jatropha curcas* L.

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), pertencente à família Euphorbiaceae, compõe um grupo de cerca de 170 espécies do gênero *Jatropha* amplamente distribuídas pelas Américas, Ásia e África (Henning, 1999). Embora não se conheça ao certo o seu centro de origem (Achten *et al.*, 2010), estudos indicam que a espécie é nativa dos países da América Central, ocorrendo de forma espontânea em cerca de 80 países na região intertropical, estendendo-se sua distribuição em outros países como Índia, China e Malásia (Singh, Singh, Raghuvanshi, *et al.*, 2013; Singh, Singh, Shukla, *et al.*, 2013) (Figura 1).



Figura 1. Centro de origem e distribuição de *Jatropha curcas* L. no mundo. Adaptado de Silitonga *et al.* (2013)

No Brasil, *J. curcas* está presente em todas regiões do país, ocorrendo naturalmente desde o estado do Maranhão até o Paraná, sobretudo nos estados de Goiás e Minas Gerais, bem como no Nordeste brasileiro (Epamig, 2003; Arruda *et al.*, 2004). O pinhão-manso apresenta essa ampla distribuição geográfica devido sua rusticidade, pouca exigência nutricional, resistência à longas estiagens, sendo assim adaptável a uma vasta condição edafoclimática (Putten *et al.*, 2010).

Botanicamente, o pinhão-mansó é classificado como um arbusto monóico, perene, de fácil propagação e rápido crescimento, embora haja registros de plantas com mais de 5 m de altura (Sunil *et al.*, 2013). Suas folhas são verdes e alternas, esparsas e largas, apresentando na maturidade entre 6 a 15 cm de comprimento, com forma variando de cordiforme à palmatilobada, com 1 a 6 lóbulos (Sunil *et al.*, 2013). Segundo a classificação de Eamus (1999), o pinhão-mansó é uma espécie semidecídua, entretanto, em regiões mais inóspitas, como o sertão nordestino, a espécie costuma se comportar como uma planta caducifólia, perdendo totalmente suas folhas durante a estiagem (Singh, Singh, Rao, *et al.*, 2013; Singh, Singh, Shukla, *et al.*, 2013). Nestas localidades, a queda quase total das folhas pode ser considerada como uma estratégia para reduzir a perda de água por transpiração em condições mais severas, podendo haver um ressurgimento de novas folhas, logo após as primeiras chuvas (Fernandes *et al.*, 2013).

A espécie apresenta várias potencialidades e aplicações: (i) na perspectiva ambiental, a planta pode ser utilizada para o controle da erosão do solo (Reubens *et al.*, 2011) mesmo em áreas com solos áridos, devido à estabilidade da estrutura de suas raízes, contribuindo assim para um aumento da cobertura vegetal em ambientes muito secos. Além disso, estudos tem reportado o pinhão-mansó como um potencial fitorremediador de solos contaminados por semi-metals e metais pesados (*i.e.* Al, Fe, Cr Mn, Ar, Zn, Cd e Pb) (Jamil *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2009), bem como com hidrocarbonetos de petróleo (Agbogidi *et al.*, 2013); (ii) no setor farmacêutico, a espécie apresenta uma relevância medicinal desde sua descoberta. O gênero *Jatropha* provem do grego *giatros* (médico) e *trophe* (nutrição), uma vez que todos seus órgãos e derivados como óleo e látex podem ser empregados na área medicinal como no tratamento de inflamações, queimaduras e cefaleias (Osoniyi e Onajobi, 2003; Mujumdar e Misar, 2004; Kaushik *et al.*, 2007), bem como na produção de purgativo, sabões e lubrificantes (Tapanes *et al.*, 2008).

Dentre suas utilidades, a grande importância econômica do pinhão-mansó se deve ao seu potencial para a produção de biodiesel, devido ao alto teor de óleo encontrado nas sementes, que pode variar entre 27 a 40% (Achten *et al.*, 2007), sendo dependente do genótipo utilizado e da condição de manejo de cultivo (Ahoton e Quenum, 2012; Kumar, 2012; Singh, Singh, Shukla, *et al.*, 2013; George *et al.*, 2016). Estudos indicam que o pinhão-mansó apresenta uma vida reprodutiva de cerca de 40 anos, produzindo, em média, 2,37 t ha⁻¹ de sementes por ano (Rocha *et al.*, 2016), correspondendo a aproximadamente 540 a 680 litros de óleo por hectare (Pompelli *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2012). Essa produtividade, entretanto, é dependente das condições ambientais e de cultivo entre as plantas, podendo ser afetada em locais com precipitações reduzidas (Openshaw, 2000).

O óleo produzido a partir do pinhão-manso tem indicação como lubrificante, além de combustível usado em motores a diesel (Kumar e Sharma, 2008). Segundo Bastos (2003), quando comparado a outras espécies oleaginosas (*e.g. Ricinus communis* e *Elaeis guineensis*), o óleo do pinhão-manso mostra-se superior, devido ao seu baixo custo de produção e, principalmente, sua composição rica em ácidos graxos insaturados, chegando a valores de até 73% (Kumar e Sharma, 2008). As propriedades do biodiesel extraído do pinhão-manso, quanto a fluidodinâmica, viscosidade, massa específica e ponto de fulgor atendem as especificações da portaria da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível (ANP) e da Sociedade Americana de Teste e Materiais (ASTM), sendo indicado como dentro dos padrões de produção de biodiesel e adequado para motores a diesel (Mofijur *et al.*, 2013).

A torta, resultante da extração do óleo, pode servir como base na alimentação animal, desde que devidamente processada para a retirada de substâncias tóxicas (Arroyo *et al.*, 2014). Além disso, os subprodutos do pinhão-manso também podem ser aproveitados em aplicações industriais, nas quais o resíduo da extração do óleo pode ser transformado e utilizado como fertilizante natural devido, principalmente, aos altos teores de nitrogênio, potássio, fósforo e matéria orgânica presentes na torta (Pompelli *et al.*, 2011).

Diante disso, na última década, o pinhão-manso vem recebendo atenção mundial e inúmeros investimentos com estudos visando o melhoramento genético e o aumento da produtividade. Nesse sentido, a empresa norte-americana *SG Biofuels* lançou uma das primeiras cultivares elite de pinhão-manso, em 2010, portando, atualmente, mais de 12.000 genótipos únicos conservados em sua coleção de germoplasma (Digest, 2011). No Brasil, a EMBRAPA Agroenergia (Brasília - DF) em conjunto com a EMBRAPA Algodão (Campina Grande - PB) se destacam por apresentar, desde 2008, projetos envolvidos na preservação de bancos ativos de germoplasma (BAG) de *J. curcas* provenientes de diferentes regiões do país, os quais dispõem de uma coleção de cerca de 400 genótipos (Laviola *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2011). Dessa forma, o desenvolvimento de pesquisas que visam a maior produtividade e o aumento da tolerância às condições extremas de espécies economicamente importantes, como o pinhão-manso, pode contribuir para domesticação dessa espécie, tornando-a uma opção potencial para o cultivo de pequenos e médios produtores do nordeste brasileiro.

3. Salinidade do solo

Várias condições ambientais, como alta temperatura, poluição por metais pesados, seca, inundação e salinidade, têm afetado a produção agrícola e a economia ao longo do tempo. Dentre essas, o solo salino é reconhecido como uma das principais ameaças aos recursos ambientais, acarretando sérios problemas para a agricultura e comprometendo o

desenvolvimento e capacidade produtiva das culturas (Shahbaz e Ashraf, 2013). Segundo Shrivastava e Kumar (2014), por definição, os solos são caracterizados como salinos quando apresentam condutividade elétrica (CE) do extrato de saturação maior do que 4 dS m^{-1} ($\sim 40 \text{ mM NaCl}$) à 25°C e porcentagem de sódio intercambiável (PSI) igual ou maior a 15%. A salinização do solo é um processo dinâmico e natural, decorrente de ação do intemperismo de rochas e minerais primários (fonte primária), e/ou podendo ser agravados pela ação humana através do desmatamento, o qual promove maior superfície de evaporação do solo, bem como através do manejo inadequado de irrigação (fonte secundária), utilizando água de baixa qualidade e em condições de drenagem deficiente (Ladeira, 2012; Allbed e Kumar, 2013).

Regiões com altas temperaturas e baixos índices pluviométricos, como as regiões áridas e semiáridas apresentam, em geral, solos naturalmente salinos, sobretudo, pelo acúmulo dos cátions Na^+ e Ca^{2+} e dos ânions Cl^- e SO_4^{2-} (Lacerda, 2005), o que as tornam, com baixo potencial agrícola, pela promoção do baixo potencial hídrico do solo. Sendo assim, a exploração dessas regiões inóspitas na agricultura só é possível através do uso de técnicas de irrigação, o que pode agravar o problema.

O estresse salino é uma das principais condições ambientais (naturais ou não) que resultam em grande impacto no crescimento vegetativo, alterando funções metabólicas, fisiológicas e anatômicas, podendo acarretar redução da produtividade de inúmeras culturas (Aragão *et al.*, 2010). As consequências associadas à salinização do solo são sentidas em todos continentes, afetando cerca de 30% das terras irrigadas (Shrivastava e Kumar, 2014). Estimativas indicam que essas áreas vem aumentando progressivamente a uma taxa de, aproximadamente 10% por ano, podendo afetar mais de 50% de todas as terras cultiváveis do mundo até 2050 (Jamil *et al.*, 2011).

3.1. Estratégias de tolerância ao estresse salino

Segundo Soni *et al.* (2014), a condição de estresse vegetal é retratada como uma alteração da condição fisiológica da planta, causada por um desequilíbrio provocado por fatores externos, podendo ser abiótico (*e.g.*, salinidade, temperatura, água) ou biótico (*e.g.*, herbívoros, pragas). Ainda segundo os autores, dependendo das condições aplicadas, o estresse pode desencadear respostas que variam desde alterações no crescimento e na produtividade vegetal, até mudanças no metabolismo celular e na expressão de genes. Assim, o tipo de resposta desencadeada por plantas em condição de estresse, pode ser definido de acordo com a duração e a intensidade imposta pelo agente estressor (Munns, 2011). Porém, nem sempre o estresse age de forma negativa no ciclo das plantas, dependendo da condição e tempo de exposição o estresse pode ser classificado como eustresse ou suave e distresse ou severo. O primeiro é dito como

um estresse estimulante, sendo um fator positivo ao desenvolvimento vegetal. Já o segundo causa danos, se tornando um fator negativo ao crescimento e desenvolvimento da planta, podendo levar a morte do indivíduo (Mishra e Prasad, 2016). Independente da sua atuação, o estresse é, naturalmente, um fator de seleção contendo elementos destrutivos e construtivos que atuam como força motriz para promover a tolerância e adaptação evolutiva (Mishra e Prasad, 2016).

A definição da tolerância e sensibilidade vegetal à uma dada condição é determinada de acordo com a resposta da planta ao efeito promovido pelo fator estressante, podendo variar entre espécie, genótipo, idade da planta, bem como intensidade e tempo de exposição ao estresse (Kranner *et al.*, 2010; Munns, 2011). Plantas sensíveis ou tolerantes a salinidade, diferem entre si pelas concentrações salinas, podendo ser classificadas como halófitas e glicófitas. As primeiras suportam a exposição em altas concentrações salinas (300 – 400 mM de NaCl). Ao contrário das halófitas, as glicófitas, as quais compreendem a maioria das culturas, não conseguem crescer com água de irrigação salina, apresentando inibição severa e chegando a morte em concentrações entre 100 – 200 mM NaCl (Carillo *et al.*, 2011).

O estresse salino afeta todos os aspectos do desenvolvimento vegetal, desde a germinação e crescimento vegetativo, até o período reprodutivo. Esses efeitos deletérios causados pela salinidade são relacionados, primeiramente, ao efeito osmótico imposto à planta, uma vez que a presença do sal na solução de solo reduz a capacidade de absorção de água pela planta (Gupta e Huang, 2014; Parihar *et al.*, 2015), estando também intimamente relacionado ao déficit hídrico. Secundariamente, os danos podem ser decorrentes pelo componente hiperiônico, promovido pelo efeito tóxico dos elevados teores de íons como Na^+ e Cl^- , os quais interferem na absorção de importantes nutrientes (desequilíbrio nutricional), e desencadeiam efeitos deletérios (Willadino e Camara, 2010; Gupta e Huang, 2014), como senescência prematura das folhas, inibição das atividades enzimáticas e na fotossíntese (Roy *et al.*, 2014; Melo *et al.*, 2017).

O estresse salino pode afetar a taxa fotossintética direta e indiretamente, sobretudo devido a redução da área foliar, alterações anatômicas, efeito citotóxico do acúmulo de íons, redução na biossíntese ou degradação da clorofila, danos ao cloroplasto e diminuição da eficiência do fotossistema (PS) II, bem como inibição das enzimas do ciclo de Calvin (Zhao *et al.*, 2013; Miralles *et al.*, 2016; Silveira e Carvalho, 2016; Sun *et al.*, 2016; Melo *et al.*, 2017).

A curto prazo, a fotossíntese pode ser comprometida pelo efeito direto do sal, via redução de assimilação de CO_2 causado pela limitação da condutância estomática (g_s) (Flexas e Medrano, 2002). Sob condições de baixo potencial hídrico, a planta tende a diminuir a abertura estomática, limitando a perda de água para a atmosfera, em detrimento da diminuição

das trocas gasosas, resultando em um desbalanço entre a luz captada e a luz utilizada na via fotoquímica, o que gera um distúrbio em todo processo energético (Silveira e Carvalho, 2016). O processo fotossintético é a principal via bioquímica vegetal, em que a energia luminosa é captada pelo complexo antena, transferida aos centros de reação do PSII e PSI, e transformadas em energia química (*quenching* fotoquímico), principalmente, na forma de ATP e NADPH, fundamentais no processo de produção de fotoassimilados. Danos em qualquer componente nos fotossistemas, causados pelo sal, resultam na supraexcitação da clorofila (clorofila tripleto), uma vez que o complexo antena passa a captar mais energia do que é transmitido e processado pela etapa fotoquímica, favorecendo a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente na forma de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Parida e Das, 2005). Essas moléculas altamente reativas podem, em altas concentrações, gerar danos a macromoléculas e estruturas biológicas vitais como ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídeos e proteínas (Foyer e Shigeoka, 2011). Nessas condições, a dissipação segura do excesso de energia na forma de calor ou por fluorescência (*quenching* não fotoquímico) protege o aparato fotossintético contra o estresse oxidativo (Silva *et al.*, 2011; Spetea *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2016).

A fim de mitigar os danos impostos pela salinidade, as plantas desenvolveram mecanismos fisiológicos e bioquímicos capazes de minimizar e suportar os danos provocados pelo sal. Dentre os principais mecanismos conhecidos estão: (i) compartimentalização de íons nocivos no vacúolo ou apoplasto celular; (ii) seletividade de absorção e transporte de íons; (iii) biossíntese de osmoprotetores e solutos compatíveis, como aminoácidos (*e.g.*, prolina), glicina betaína, açúcares, polióis (*e.g.*, manitol, sorbitol e pinitol) e poliaminas (*e.g.* putrescina, espermidina e espermina), responsáveis pelo ajuste osmótico; (iv) ativação e biossíntese de compostos e enzimas antioxidantes (*e.g.* superóxidos dismutase – SOD, catalase – CAT, ascorbato peroxidase – APX, glutatona redutase – GR e glutatona peroxidase – GPX), envolvidos na preservação da produção de radicais livres ou no sequestro de EROs precursores de estresse oxidativo; (v) componente inorgânico e regulação hormonal, esses últimos envolvidos na regulação de várias vias no crescimento, como respiração, fechamento estomático e sinalização celular (Willadino e Camara, 2010; Munns, 2011; Gupta e Huang, 2014).

A tolerância das plantas à condição de estresse está relacionada à habilidade de enfrentar e superar um ambiente desfavorável. As respostas das plantas à salinidade e o desenvolvimento da tolerância aos sais envolve uma variedade de mecanismos complexos e interligados, os quais podem estar envolvidos na transdução de sinais e na regulação da expressão gênica (Shen *et al.*, 2016). Dentre eles estão os genes que codificam e modulam as proteínas da síntese hormonal e antioxidantes, estabilizadoras de membrana, além de defensinas e chaperonas (Lay

e Anderson, 2005; Li *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2013; Esch e Schaffrath, 2017).

4. *Análise proteômica*

A resposta vegetal à salinidade é um processo complexo que envolve mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares para auxiliar no combate ao estresse osmótico e/ou iônico, envolvendo a síntese de hormônios, enzimas antioxidativas e de solutos compatíveis, bem como o controle de exclusão, compartimentalização e inclusão de íons pela raiz e seu transporte para a parte aérea (Roy *et al.*, 2014; Mostek *et al.*, 2015). A grande maioria dessas respostas, frente às condições adversas, decorrem da regulação na expressão gênica, por meio da ativação ou inibição de genes específicos, e do acúmulo de proteínas relacionadas ao processo biológico em questão (Zhu, 2002; Kurusu *et al.*, 2015).

Diante dessas respostas, a análise proteômica é uma importante ferramenta para compreender os mecanismos de tolerância das plantas, fornecendo importantes informações frente a dinâmica da expressão proteica e modificação pós-traducional (Barkla *et al.*, 2013), uma vez que as alterações celulares podem ser reguladas por proteínas pré-existentes, as quais são degradadas ou modificadas pós-traducionalmente. Sendo assim, a possibilidade de variações no processamento do RNAm, por *splicing* alternativo, permite a expressão de isoformas proteicas a partir de uma mesma sequência gênica (Quirino *et al.*, 2010). Uma vez que as proteínas são os efetores diretos da resposta ao estresse e estão próximas dos fenômenos fisiológicos, os estudos proteômicos se mostram necessários e vantajosos, quando os mesmos visam conhecer o conjunto de proteínas expressas em determinada situação de estresse e, conseqüentemente, compreender mais profundamente as alterações de expressão genética e os mecanismos de regulação mediante as condições adversas (Gupta e Huang, 2014).

A determinação do perfil proteômico é dado através de técnicas cada vez mais avançadas, porém, apesar desses avanços, a eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (SDS PAGE 2-D) permanece sendo o método base na separação de proteínas (Sobhanian *et al.*, 2011), o qual são utilizadas propriedades fundamentais intrínsecas da proteína, como o seu ponto isoelétrico (PI) em um gradiente de pH e sua massa molecular (MM) (Jorrín-Novo *et al.*, 2009). Desta forma, os mapas proteicos fornecem informações importantes quanto a localização e característica da proteína, bem como distribuição e diversidade proteica da amostra.

Com o mapa bidimensional das proteínas em gel, é possível reconhecer as proteínas (*spots*) diferencialmente acumuladas (DAPs) entre contrastes e realizar a identificação proteica com a obtenção da sequência de peptídeos, resultantes da digestão enzimática, através da espectrometria de massa por ionização/dessorção a laser assistida por matriz associada ao tempo de voo (MALDI-TOF) (Jorrín-Novo *et al.*, 2009). A espectrometria de massa é uma técnica

analítica acurada, rápida e sensível, o qual determina a massa moleculares em Daltons (Da) a partir da razão entre a massa e a carga (m/z) de moléculas ionizadas em fase gasosa (Zhang *et al.*, 2013), baseada na sua movimentação por um campo elétrico ou magnético.

Os espectros dos peptídeos com picos de intensidade e suas respectivas massas moleculares (*Peptide Mass Fingerprint* – PMF) são correlacionados em um banco de dados e, dessa associação, é atribuído um grau de similaridade (*score*) significativo, baseado em critérios específicos como tolerância de erro em Da dos peptídeos analisados, modificação fixa e variável, além da enzima utilizada. Sendo assim, dessa etapa é gerada uma relação de proteínas candidatas, com melhores *score*, os quais serão presumivelmente identificadas e validadas, buscando elucidar o processo de regulação gênica envolvida na tolerância ao estresse.

Nos últimos anos, diversos estudos de análise proteômica tem sido direcionados ao pinhão-mansão, principalmente em relação às sementes e ao desenvolvimento do endosperma (Shah *et al.*, 2015), tegumento (Soares *et al.*, 2014; Shah *et al.*, 2016), embrião (Liu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011), plastídeo de sementes em desenvolvimento (Pinheiro *et al.*, 2013), bem como a produção e translocação do óleo (Yang *et al.*, 2009; Popluechai *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015), visando o melhoramento genético da espécie para a indústria de biodiesel. Porém, poucos trabalhos empregam a identificação de DAPs na compreensão das respostas frente a estresses abióticos em pinhão-mansão. A integração de diferentes ferramentas, como estudos fisiológicos aliados a técnicas avançadas e estudos conjuntos das análises “ômicas” tais como genômica, proteômica, e metabolômica, contribuem para melhor compreensão do funcionamento celular, sobretudo quando aplicada a plantas de interesse biotecnológico. Dessa forma, esse trabalho contribui para a compreensão dos mecanismos e variações das respostas de *J. curcas*, bem como dos diferentes genótipos dessa espécie frente ao estresse salino, contribuindo na identificação de marcadores moleculares frente a condição estressante, sendo importante ferramenta no melhoramento assistido de plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHTEN, W. M. J. et al. *Jatropha* biodiesel fueling sustainability? **Biofuel, Bioprod. Bior.**, v. 1, p. 283-291, 2007.
- ACHTEN, W. M. J. et al. Towards domestication of *Jatropha curcas*. **Biofuels**, v. 1, n. 1, p. 91-107, 2010.
- ACIKGOZ, E. et al. Forage soybean production for seed in mediterranean environments. **Field Crops Res**, v. 110, n. 3, p. 213-218, 2009.
- AGBOGIDI, O. M.; MARIERE, A. E.; OHWO, A. Metal concentration in plants tissues of

Jatropha curcas L. grown in crude oil contaminated soil. **J Bioinnovation**, v. 2, n. 3, p. 137-145, 2013.

AHOTON, L. E.; QUENUM, F. Floral biology and hybridization potential of nine accessions of physit nut (*Jatropha curcas* L.) originating from three continents. **Tropicultura**, v. 30, n. 4, p. 193-198, 2012.

AIRBUS. TAM Airlines and Airbus first to fly *Jatropha*-based biofuel in Latin America. 2016. Disponível em: < <http://www.airbus.com/presscentre/pressreleases/press-release-detail/detail/tam-airlines-and-airbus-first-to-fly-jatropha-based-biofuel-in-latin-america/> >. Acesso em: Jan 26.

ALLBED, A.; KUMAR, L. Soil salinity mapping and monitoring in arid and semi-arid regions using remote sensing technology: A review. **Adv Remote Sens**, v. 2, n. 4, p. 373-385, 2013.

ARAGÃO, R. M. et al. Absorção, fluxo no xilema e assimilação do nitrato em feijão-caupi submetido à salinidade. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 01, p. 100-106, 2010.

ARROYO, B. J. et al. Desintoxicación de la torta de *Jatropha curcas* L. como alternativa de alimento para ganado bovino. **Rev Actualidad & Divulgación Científica**, v. *in press*, 2014.

ARRUDA, F. P. et al. Cultivo do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido Nordeste. **Rev Bras Oleag Fib**, v. 8, p. 789-799, 2004.

BARKLA, B. J.; VERA-ESTRELLA, R.; PANTOJA, O. Progress and challenges for abiotic stress proteomics of crop plants. **Proteomics**, v. 13, p. 1801-1815, 2013.

BASTOS, R. K. X. **Utilização de esgotos tratados em fertirrigação, hidroponia e piscicultura**. Rio de Janeiro: ABES, 2003. 253.

BRASIL. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**. Brasília: Ministério da Indústria e do Comércio, Secretaria de Tecnologia Industrial, 1985. 364.

_____. Rendimento na produção agropecuária no Brasil. Brasília, 2011. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/> >. Acesso em: 10 abr.

_____. Boletim mensal do Biodiesel., Brasília, 2016. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/?dw=80664> >. Acesso em: 24 ago 2017.

CAMPOS, M. L. O. et al. Photosynthesis and antioxidant activity mechanisms in *Jatropha curcas* L. under salt stress. **Braz J Plant Physiol**, v. 24, n. 1, p. 55-67, 2012.

CARILLO, P. et al. Salinity stress and salt tolerance. In: SHANKER, A. K. e VENKATESWARLU, B. (Ed.). **Abiotic Stress in Plants—Mechanisms and Adaptations**. Rijeka, Croatia: InTech, 2011. p.21-38.

DIGEST, B. *Jatropha* blooms again: SG Biofuels secures 250K acres for hybrids. 2011. Disponível em: < <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2011/05/16/> >. Acesso em: 24 Ago.

DUARTE, A. Esperança nacional. **Biodieselbr**, v. 1, n. 1, p. 24-34, 2008.

EAMUS, D. Ecophysiological traits of deciduous and evergreen woody species in the

seasonally dry tropics. **Trends Ecol Evol**, v. 14, n. 1, p. 11-16, 1999.

EPAMIG. Coletânea sobre pinhão-manso. 2003. Disponível em: < http://www.agroecologia.pro.br/arquivos/aulas/saf/especies_safs/pinhao_manso.pdf >. Acesso em: 07 setembro.

ESCH, L.; SCHAFFRATH, U. An update on jacalin-like lectins and their role in plant defense. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 7, p. 1592, 2017.

ESCOBAR, J. C. et al. Biofuels: Environment, technology and food security. **Renew Sust Energy Rev**, v. 13, n. 6-7, p. 1275-1287, 2009.

FARIAS, L. A. Biodiesel: histórico, uso de impactos ambientais. Campina Grande, 2012. Disponível em: < www.portaleducação.com.br/biologia/artigos/16994/biodiesel-historico-uso-e-impactos-ambientais >. Acesso em: 04 de outubro.

FERNANDES, J. D. et al. Fenologia e produção do pinhão-manso cultivado com diferentes fontes de adubação. **Rev Ciência Agr**, v. 44, n. 2, p. 339-346, 2013.

FLAGELLA, Z. et al. Effect of saline water on oil yield and quality of a high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrid. **Europ J Agronomy**, v. 21, n. 2, p. 267-272, 2004.

FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. **Ann Bot**, v. 89, n. 2, p. 183–189, 2002.

FONTES, G. A.; FONTES, K. A. O plano nacional de biodiesel: PNPB a partir de uma análise do princípio constitucional da redução das desigualdades sociais e regionais. Anais, 2010, Fortaleza.

FOYER, C. H.; SHIGEOKA, G. Understanding oxidative stress and antioxidant aunctions to enhance photosynthesis. **Plant Physiol**, v. 155, p. 93-100, 2011.

GARG, N.; SINGLA, R. Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress. **Braz J Plant Physiol**, v. 16, n. 3, p. 137-146, 2004.

GEORGE, A. K.; PARTHIBAN, K. T.; KUMAR, V. Development and documentation of descriptors for *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) and their hybrid derivatives. **Indian J Biodivers**, v. 24, n. 1, p. 8-26, 2016.

GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. **Int J Genomics**, v. 2014, p. 18 pages, 2014.

HENNING, R. K. **The *Jatropha* System in Zambia**. Evaluation of the existing *Jatropha* activities and proposals for an implementation strategy in Southern Province of Zambia. Germany 1999.

JAMIL, A. et al. Gene expression profiling of plants under salt stress. **Crit Rev Plant Sci**, v. 30, n. 5, p. 435-458, 2011.

JAMIL, S. et al. *Jatropha curcas*: a potencial crop for phytoremediation of coal fly ash. **J Hazard Mater**, v. 172, n. 269-275, 2009.

- JORRÍN-NOVO, J. V. et al. Plant proteomics update (2007–2008): second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **J Proteom**, v. 72, n. 3, p. 285-314, 2009.
- KAUSHIK, N. et al. Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, p. 497-502, 2007.
- KRANNER, I. et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytol**, v. 188, p. 655-673, 2010.
- KUMAR, A. *Jatropha curcas*: high yielding accessions and improvements. Cartajena, Colômbia, 2012. Disponível em: < www.corpoica.org.co/SitioWeb/Documento/JatrophaContrataciones/RAJASTAN-PROF.KUMAR.pdf >. Acesso em: 04 de outubro.
- KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Ind Crops Prod**, v. 28, p. 1-10, 2008.
- KURUSU, T.; KUCHITSU, K.; TADA, Y. Plant signaling networks involving Ca²⁺ and Rboh/Nox-mediated ROS production under salinity stress. **Front Plant Sci**, v. 6, p. 427, 2015.
- LACERDA, C. F. Interação salinidade x nutrição mineral. In: NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L., et al (Ed.). **Estresses ambientais: Danos e benefícios em plantas**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. p.127-137.
- LADEIRO, B. Saline agriculture in the 21st century: Using salt contaminated resources to cope food requirements. **J Bot**, v. 2012, p. 1 - 7 2012.
- LAVIOLA, B. G. et al. Genetic parameters and variability in physic nut accessions during early developmental stages. **Pesq Agrop Bras**, v. 45, n. 10, p. 1117-1123, 2010.
- LAY, F. T.; ANDERSON, M. A. Defensins--components of the innate immune system in plants. **Curr Protein Pept Sci**, v. 6, n. 1, p. 85-101, 2005.
- LI, A. et al. Biotic and abiotic stress responses through calcium-dependent protein kinase (CDPK) signaling in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Signal Behav**, v. 3, n. 9, p. 654-656, 2008.
- LINDFELDT, E. G.; WESTERMARK, M. O. Biofuel production with CCS as a strategy for creating a CO₂-neutral road transport sector. **Energy Procedia**, v. 1, p. 4111-4118, 2009.
- LIU, H. et al. A comparative analysis of embryo and endosperm proteome from seeds of *Jatropha curcas*. **J IntegrPlant Biol**, v. 51, n. 9, p. 850-857, 2009.
- LIU, H. et al. Proteomic analysis of oil bodies in mature *Jatropha curcas* seeds with different lipid content. **J Proteom**, v. 13, p. 403-414, 2015.
- LIU, H. et al. Proteomic analysis of the seed development in *Jatropha curcas*: From carbon flux to the lipid accumulation. **J Proteom**, v. 91, p. 23-40, 2013.
- LIU, H. et al. The differential proteome of endosperm and embryo from mature seed of

Jatropha curcas. **Plant Sci**, v. 181, n. 6, p. 660-666, 2011.

MARENGO, J. A. et al. Development of regional future climate change scenarios in South America using the Eta CPTEC/HadCM3 climate change projections: climatology and regional analyses for the Amazon, São Francisco and the Paraná River basins. **Clim Dynam**, v. 38, n. 9-10, p. 1829-1848, 2012.

MELO, H. F. et al. Gas exchange and photosynthetic pigments in bell pepper irrigated with saline water. **Rev Bras Eng Agr Amb**, v. 21, n. 1, p. 38-43, 2017.

MIRALLES, J. et al. Effects of pot-in-pot production system on water consumption, stem diameter variations and photochemical efficiency of spindle tree irrigated with saline water. **Agr Water Manage**, v. 170, p. 167-175, 2016.

MISHRA, P.; PRASAD, S. M. Mounting insights over human wellness by utilizing plant's primed defense against precise/mild oxidative stress. **Crop Res**, v. 51, n. 1, p. 1-10, 2016.

MOFIJUR, M. et al. Evaluation of biodiesel blending, engine performance and emissions characteristics of *Jatropha curcas* methyl ester: Malaysian perspective. **Energy**, v. 55, p. 879-887, 2013.

MOSTEK, A. et al. Alterations in root proteome of salt-sensitive and tolerant barley lines under salt stress conditions. **J Plant Physiol**, v. 174, p. 166-176, 2015.

MUJUMDAR, A. M.; MISAR, A. V. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats. **J Ethnopharmacol**, v. 90, p. 11-15, 2004.

MUNNS, R. Plant adaptation to salt and water stress: differences and commonalities. **Adv Bot Res**, New York, v. 57, n. 1, p. 1-32, 2011.

NOCTOR, G.; VELJOVIC-JOVANOVIC, S.; FOYER, C. Drought and oxidative load in wheat leaves. A predominant role for photorespiration? **Ann Botany**, v. 89, p. 841-850, 2002.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass Bioenerg**, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2000.

OSONIYI, O.; ONAJOBI, F. Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. **J Ethnopharmacol**, v. 89, p. 101-105, 2003.

PANDEY, V. C. et al. *Jatropha curcas*: A potential biofuel plant for sustainable environmental development. **Renew Sust Energy Rev**, v. 16, n. 5, p. 2870-2883, 2012.

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado**. Fortaleza: Unigráfica, 2003.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotox Environ Safe**, v. 60, n. 3, p. 324-349, 2005.

PARIHAR, P. et al. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. **Environ Sci Pollut Res**, v. 22, n. 6, p. 4056-75, 2015.

PINHEIRO, C. B. et al. Proteome analysis of plastids from developing seeds of *Jatropha*

curcas l. **J Proteome Res**, v. 12, n. 11, p. 5137-5145, 2013.

POMPELLI, M. F. et al. Environmental influence on the physico-chemical and physiological properties of *Jatropha curcas* L. seeds. **Aust J Bot**, v. 58, n. 6, p. 421-427, 2010.

POMPELLI, M. F. et al. Crise energética mundial e o papel do Brasil na problemática de biocombustíveis. **Revista Agronomía Colombiana**, v. 29, n. 2, p. 361-371, 2011.

POPLUECHAI, S. et al. *Jatropha curcas* oil body proteome and oleosins: L-form JcOle3 as a potential phylogenetic marker. **Plant Physiol Bioch**, v. 49, n. 3, p. 352-356, 2011.

PUTTEN, E.; FRANKEN, Y. J.; JONGH, J. General data on *Jatropha*. In: JONGH, J. (Ed.). **The *Jatropha* handbook: from cultivation to application**. Netherlands: FACT Foundation, 2010. p.1-7.

QUIRINO, B. F. et al. Proteomic approaches to study plant–pathogen interactions. **Phytochemistry**, v. 71, p. 351-362, 2010.

RAMOS, L. P. Papel dos biocombustíveis no cenário Brasileiro. Anais do Congresso Brasileiro de Soja, 1999, Londrina. Centro Nacional de Pesquisa de Soja; Empresa Nacional de Pesquisa Agropecuária. p.233.

REUBENS, B. et al. More than biofuel? *Jatropha curcas* root system symmetry and potential for soil erosion control. **J Arid Environ**, v. 75, n. 2, p. 201-205, 2011.

ROCHA, B. R. et al. Adaptabilidade e estabilidade de progênies de meios-irmãos de pinhão-mansão em diferentes regiões do Brasil. **Rev Ceres**, v. 63, p. 174-182, 2016.

ROY, S. J.; NEGRÃO, S.; TESTER, M. Salt resistant crop plants. **Curr Opin Biotechnol**, v. 26, n. 1, p. 115 - 124, 2014.

SEBRAE. **Biodiesel**. Brasília: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2010. 68.

SHAH, M. et al. Proteomic analysis of the endosperm ontogeny of *Jatropha curcas* L. seeds. **J Proteome Res**, v. 14, n. 6, p. 2557-2568, 2015.

SHAH, M. et al. Deep proteome analysis of gerontoplasts from the inner integument of developing seeds of *Jatropha curcas*. **J Proteomics**, v. 143, p. 346-352, 2016.

SHAHBAZ, M.; ASHRAF, M. Improving salinity tolerance in cereals. **Crit Rev Plant Sci**, v. 32, p. 237-249, 2013.

SHEN, Q. et al. Multi-omics analysis reveals molecular mechanisms of shoot adaption to salt stress in Tibetan wild barley. **BMC Genomics**, v. 17, p. 889, 2016.

SHRIVASTAVA, P.; KUMAR, R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. **Saudi J Biol Sci**, v. 22, p. 123-131, 2014.

SILITONGA, A. S. et al. A global comparative review of biodiesel production from *jatropha curcas* using different homogeneous acid and alkaline catalysts: Study of physical and chemical

properties. **Renew Sustain Energy Rev**, v. 24, p. 514-533, 2013.

SILVA, E. N. et al. Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. **Journal of Arid Environments**, v. 74, p. 1130-1137, 2010.

_____. Salt stress induced damages on the photosynthesis of physic nut young plants. **Sci Agric**, v. 68, n. 1, p. 62-68, 2011.

SILVA, E. N. et al. Physiological adjustment to salt stress in *Jatropha curcas* is associated with accumulation of salt ions, transport and selectivity of K⁺, osmotic adjustment and K⁺/Na⁺ homeostasis. **Plant Biol**, v. 17, n. 1, p. 1023-1029, 2015. ISSN 1435-8603.

SILVEIRA, J. A. G.; CARVALHO, F. E. L. Proteomics, photosynthesis and salt resistance in crops: An integrative view. **J Proteom**, v. 143, p. 24-35, 2016.

SINGH, B. et al. Global agro-ecological challenges in commercial biodiesel production from *Jatropha curcas*: Seed productivity to disease incidence. In: BHARDWAJ, A. e ZENONE, T. (Ed.). **Sustainable Biofuels : An Ecological Assessment of the Future Energy**. Berlin: HEP-China & De Gruyter-Germany, v.in press, 2013.

SINGH, B. et al. Agro-technology of *Jatropha curcas* for diverse environmental conditions in India. **Biomass Bioenerg**, v. 48, n. 1, p. 191-202, 2013.

SINGH, B. et al. The field performance of some accessions of *Jatropha curcas* L. (biodiesel plant) on degraded sodic land in North India. **Int J Green Energy**, v. 10, n. 10, p. 1026-1040, 2013.

SLAMA, I. et al. Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. **Ann Bot**, v. 115, n. 3, p. 433-447, 2015.

SOARES, E. L. et al. Proteome analysis of the inner integument from developing *Jatropha curcas* L. seeds. **J Proteome Res**, v. 13, n. 8, p. 3562-3570, 2014.

SOBHANIAN, H.; AGHAEI, K.; KOMATSU, S. Changes in the plant proteome resulting from salt stress: Toward the creation of salt-tolerant crops? **J Proteom**, v. 74, n. 1, p. 1323 - 1337, 2011.

SONI, P. et al. Classification of plant responses to drought stress. **Res Environ Life Sci**, v. 7, n. 2, p. 69-80, 2014.

SOUSA, F. F. et al. **Caracterização de genótipos de pinhão manso do banco ativo de germoplasma da embrapa algodão. II Congresso Brasileiro de Pesquisas de Pinhão-manso.** Brasília 2011.

SPETEA, C.; RINTAMÄKI, E.; SCHOEFS, B. Changing the light environment: chloroplast signalling and response mechanisms. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, v. 369, n. 1640, p. 20130220, 2014.

SUN, Z. W. et al. Salt response of photosynthetic electron transport system in wheat cultivars with contrasting tolerance. **Plant Soil Environ**, v. 62, n. 11, p. 515-521, 2016.

- SUNIL, N. et al. Minimal descriptors for characterization and evaluation of *Jatropha curcas* L. germplasm for utilization in crop improvement. **Biomass Bioenerg**, v. 48, n. 1, p. 239-249, 2013.
- TAPANES, N. C. O. et al. Transesterification of *Jatropha curcas* oil glycerides: Theoretical and experimental studies of biodiesel reaction. **Fuel**, v. 87, n. 10-11, p. 2286-2295, 2008.
- TORRES, C. M. M. E. et al. Biomass and carbon stock in *Jatropha curcas* L. **Cerne**, v. 17, n. 3, p. 353-359, 2011.
- VAN ROOIJEN, L. W. Pioneering in marginal fields: *Jatropha* for carbon credits and restoring degraded land in eastern Indonesia. **Sustainability**, v. 6, p. 2223-2247, 2014.
- WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Tolerância das plantas à salinidade: Aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, p. 1-18, 2010.
- YADAV, S. K. et al. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L.: impact of dairy sludge and biofertilizer. **Bioresour Technol**, v. 100, p. 4616-4622, 2009.
- YANG, M. F. et al. Proteomic analysis of oil mobilization in seed germination and postgermination development of *Jatropha curcas*. **J Proteome Res**, v. 8, n. 3, p. 1441-1451, 2009.
- ZHANG, Y. et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chem Rev**, v. 113, n. 4, p. 2343-2394, 2013.
- ZHAO, Q. et al. Proteomics-based investigation of salt-responsive mechanisms in plant roots. **J Proteom**, v. 82, p. 230-253, 2013.
- ZHU, J.-K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annu Rev Plant Biol**, v. 53, n. 1, p. 247-273, 2002.

ARTIGO I

*ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA **BIOMASS & BIOENERGY****

* ISSN: 0961-9534, fator de impacto 3.219, qualis A2 em Biodiversidade.

1 Tolerância à salinidade em *Jatropha curcas*: aspectos 2 fisiológicos genótipo-dependentes

3 Natália Corte-Real^{a,b}, Pedro Victor Vieira da Cunha de Miranda^b, Laurício Endres^c, Tercílio Calsa Junior^d,
4 Edivan Rodrigues de Souza^e, Marcelo Francisco Pompelli^{*b}

6 ^a Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de
7 Pernambuco, Recife - PE, 52171-900, Brasil. E-mail: nataliacreal@gmail.com

8 ^b Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco,
9 Recife - PE, 50670-901, Brasil. E-mail: pedro_vitorvieira@yahoo.com

10 ^c Laboratório de Fisiologia Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Maceió
11 - AL, 57072-900, Brazil. E-mail: lauricioendres@hotmail.com

12 ^d Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Centro de Biociências, Universidade Federal de
13 Pernambuco, Recife - PE, 50670-901, Brasil. E-mail: tercilio@ufpe.br

14 ^e Laboratório de Física do Solo, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
15 Recife - PE, 52171-900, Brasil. E-mail: edivan.rodrigues@ufrpe.br

16 * Corresponding author: M.F. Pompelli Tel.: +55 81 2126 8352.

17 Email: marcelo.pompelli@ufpe.br

20 **Resumo**

21 Resultados divergentes sobre a tolerância de *Jatropha curcas* obtidos por diferentes
22 grupos de pesquisa em diversos países nos fazem acreditar que a tolerância está atrelada
23 aos genótipos estudados. Para verificar esta hipótese, este trabalho comparou as respostas
24 ecofisiológicas e nutricionais de diferentes genótipos de *J. curcas* submetidos ao estresse
25 salino. Sementes de seis genótipos de *J. curcas* (CNPAE112, CNPAE114, JCAL171,
26 CNPAE183, CNPAE218, CNPAE304) foram germinadas e fertirrigadas por três meses
27 com solução de Hoagland a 50%. Na sequência, receberam diferentes concentrações de
28 NaCl (0, 250, 500 e 750 mM) acrescidas à solução nutritiva por 48 h (máximo estresse).
29 Posteriormente, o sal foi lavado do substrato e as plantas voltaram a ser fertirrigadas com
30 solução nutritiva isentas de NaCl por 35 dias para recuperação. Foram realizadas
31 avaliações de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, potencial osmótico da folha e
32 teores de macro e micronutrientes foliares. A diferença entre genótipos foi observada no
33 tratamento de 750 mM de NaCl, no qual os genótipos CNPAE112, CNPAE114 e
34 CNPAE183 apresentam uma rápida e completa recuperação das trocas gasosas após

35 atingirem o máximo estresse. No entanto, CNPAE218 e CNPAE304 não apresentaram
36 recuperação completa das taxas fotossintéticas. Na presença do sal, o genótipo
37 CNPAE304 apresentou um acúmulo de 66,5 % de Na⁺ nas suas folhas quando comparada
38 a CNPAE183. Sendo assim, analisando conjuntamente os dados obtidos, verificou-se que
39 CNPAE112, CNPAE114 e CNPAE183 apresentaram maior tolerância ao estresse salino,
40 enquanto CNPAE218 e CNPAE304 se apresentaram mais sensíveis. O genótipo
41 JCAL171 mostrou moderada tolerância, quando comparada aos outros genótipos.

42

43 **Palavras-chave:** NaCl, biodiesel, pinhão-manso, estresse abiótico, trocas gasosas

44

45 **1. Introdução**

46 Grande parte dos solos ao redor do mundo são acometidos pela presença de sais,
47 os quais podem promover estresse salino nas plantas e limitam a produção de culturas
48 [1]. A salinidade é um dos estresses abióticos mais severos enfrentados pelas plantas,
49 pois, além de reduzir o potencial hídrico do solo, o estresse salino está intimamente ligado
50 ao estresse osmótico e promoção de condição hiperiônica nas plantas [2]. Nesse sentido,
51 altas concentrações salinas causam desequilíbrio iônico, perturbação na homeostase de
52 íons das células vegetais, além de afetar a distribuição e o fornecimento de nutrientes
53 essenciais como K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ [2]. Todas essas alterações acarretam distúrbios
54 fisiológicos e bioquímicos, comprometendo o crescimento e desenvolvimento vegetal [3],
55 o que, a longo prazo, pode afetar a produtividade das espécies [4]. O impacto do estresse
56 salino em vias energéticas, como a fotossíntese, está diretamente relacionado com a
57 redução da disponibilidade e difusão de CO₂ causada por limitações estomática e
58 mesofílicas, bem como alterações no aparato fotossintético [5]. As respostas das plantas
59 frente ao estresse salino dependem de inúmeros fatores, como a concentração de sais no

60 solo, o tempo de exposição à condição estressante, a idade da planta, a espécie vegetal,
61 bem como o genótipo ou variedade estudada [6], de forma que as plantas podem ser
62 classificadas em tolerantes ou sensíveis à salinidade [4].

63 *J. curcas* vem sendo popularizada como uma fonte promissora de energia
64 renovável, pela produção de biodiesel. Esse potencial deve-se a exploração das suas
65 sementes devido a sua intensa produtividade, a qual varia de 0,4 a 12 t ha⁻¹ ano⁻¹ após os
66 5 primeiros anos [7], bem como ao alto teor de óleo encontrado nelas (25 a 38%) [8, 9].
67 O óleo extraído das sementes dessa espécie tem sido empregado para inúmeras
68 finalidades devido as suas características diferenciadas como: baixa acidez, boa
69 estabilidade à oxidação e excelentes propriedades de fluidez em temperaturas baixas,
70 tendo aplicação na indústria cosmética e medicinal, na produção de purgativo e pomadas,
71 bem como na fabricação de tintas e sabões [10]. Porém, sua maior utilização é na
72 produção de biocombustível, onde o óleo do pinhão-manso tem também indicação como
73 lubrificante usado em motores a diesel [11], mostrando-se superior quando comparado ao
74 de outras espécies oleaginosas (*e.g. Ricinus communis* e *Elaeis guineenses*), devido ao
75 baixo custo de produção e, principalmente, pela composição rica em ácidos graxos
76 insaturados (~73%) [11]. O baixo custo do biodiesel é o aspecto mais importante da
77 promoção de *J. curcas* para a produção de biocombustíveis, tratando-se de uma espécie
78 de fácil produção de matéria-prima, fácil extração de óleo e transesterificação [9].

79 Características de potencial econômico, rápido crescimento, fácil propagação [12]
80 e ampla adaptação ambiental [9, 13-23] tornaram esta espécie um potencial modelo para
81 futuros estudos de tolerância à salinidade. Dessa maneira, diversos trabalhos vêm sendo
82 desenvolvidos nos últimos anos, buscando compreender e explorar os diferentes
83 mecanismos de resposta do pinhão-manso frente a diversas condições ambientais [4, 17,
84 24]. Porém, ainda não há consenso sobre a tolerância desta espécie à salinidade. Uma das

85 causas dessa divergência pode estar relacionada à diversidade de respostas fisiológicas
 86 entre genótipos nos diferentes estudos [25]. Neste sentido, a principal hipótese que este
 87 estudo pretende avaliar é se pode ser eleito um ou mais genótipos que apresentem
 88 características ecofisiológicas de tolerância, que possam de alguma forma auxiliar na
 89 seleção de genótipos elites. Baseado nisso, este trabalho teve como objetivo avaliar as
 90 respostas ecofisiológicas e possíveis alterações nutricionais em seis genótipos de *J.*
 91 *curcas*.

92

93 2. Material e Métodos

94 2.1. Material vegetal e condições de crescimento

95 O experimento foi realizado em casa de vegetação, localizada na Universidade
 96 Federal de Pernambuco (8°02' S, 39°56' W, 15 m a.s.l), entre nov/2014 e dez/2015.
 97 Sementes de seis genótipos de *J. curcas* (Tabela 1) cedidas pela EMBRAPA Agroenergia
 98 (Brasília, DF – Brasil) e provenientes de diferentes regiões do Brasil, foram armazenadas
 99 [26] até o uso.

100 Tabela 1. Procedência e localização geográfica da origem dos seis genótipos de *Jatropha curcas*
 101 selecionados.

Genótipo	Cidade – Estado	Localização geográfica
CNPAE112	Petrolina – PE	09°04'04''S, 40°19'06,36''W/382 m a.s.l.
CNPAE114	Umarama – PR	23°47'55''S, 53°18'48''W / 430 m a.s.l.
JCAL171	Rio Largo – AL	09°28'42''S, 35°51'21''W / 134 m a.s.l.
CNPAE183	Jaíba – MG	15°10'03''S, 43°53'18,4''W / 478 m a.s.l.
CNPAE218	São Miguel do Araguaia – GO	13°55'57''S, 50°09'17''W / 350 m a.s.l.
CNPAE304	Campina Grande – PB	07°13'33,41''S, 35°54'88''W/539 m a.s.l.

102

103 Cerca de 20 sementes de cada genótipo foram germinadas em bandejas de
 104 polipropileno (200 x 200 x 50 mm) contendo 5 kg de areia lavada de rio.
 105 A partir do surgimento dos eófilos, as plântulas foram padronizadas e individualizadas
 106 em vasos plásticos (9,0 L), preenchidos com areia lavada, onde as plântulas

107 permaneceram por 15 dias, sendo fertirrigadas a cada dois dias com solução nutritiva de
108 Hoagland [27] a 50% (pH 5,8). Posteriormente, as soluções nutritivas a 50% foram
109 substituídas pela solução de Hoagland 100%, na qual as plantas permaneceram até
110 atingirem três meses. A partir desse momento, cada planta foi irrigada diariamente, de
111 acordo com o tratamento, com 800 mL de solução salina (volume suficiente para ocorrer
112 lixiviação), sempre nas primeiras horas da manhã (06:00-07:00 h) por três dias. Os
113 tratamentos salinos foram compostos por diferentes concentrações de cloreto de sódio
114 (NaCl) acrescidas à solução nutritiva de Hoagland, constituindo quatro diferentes
115 tratamentos: 0, 250, 500 e 750 mM de NaCl, correspondendo, respectivamente, a 1,4;
116 23,1; 36,3 e 46,8 dS m⁻¹ de condutividade elétrica.

117 As plantas de *J. curcas* permaneceram sob tratamento salino por 48 h.
118 Posteriormente a condição salina foi retirada do sistema com contínuas lavagens com
119 água deionizada. A completa retirada da condição salina do substrato foi comprovada
120 com a diminuição da condutividade elétrica do lixiviado, o qual foi sempre inferior a
121 3 dS m⁻¹. Na sequência, as plantas voltaram a receber solução nutritiva de Hoagland onde
122 se avaliou o retorno a condição de recuperação das trocas gasosas por 35 dias. Durante
123 todo experimento, as plantas foram submetidas a condições ambientais de temperatura e
124 umidade relativa do ar.

125

126 2.2. Medidas de trocas gasosas

127 Os dados de trocas gasosas foram obtidos de uma folha saudável e completamente
128 expandida, pertencente ao terço médio da planta, previamente marcada. Dados da (i) taxa
129 líquida de assimilação de CO₂ por unidade de área (*A*), (ii) condutância estomática (*g_s*) e
130 (iii) a razão entre a concentração externa e interna de CO₂ na câmara subestomática
131 (*C_i/C_a*) foram mensurados através de um analisador de gases por infravermelho (IRGA)

132 modelo 6400 (Li-COR, Lincoln, NE, USA) [28]. As medidas foram realizadas sob 1.000
133 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR), através de iluminação
134 artificial do tipo LED e concentração de CO_2 fixada em 390 ppm. As leituras foram
135 iniciadas antes da aplicação dos tratamentos salinos (07:00 h, tempo zero) e, então, a cada
136 duas horas (09:00, 11:00, 13:00, 15:00 h), até atingir o ponto de máximo estresse com 48
137 h de exposição à solução salina. Foi considerado máximo estresse quando as plantas
138 submetidas ao tratamento salino atingiram A constante e inferiores a 10% dos valores
139 registrados pelas plantas controle. Após a retirada do sal do sistema (período de
140 recuperação), as trocas gasosas foram mensuradas semanalmente, sempre por volta das
141 09:00 h. As plantas foram consideradas recuperadas quando A das plantas estressadas
142 foram semelhantes ($p \geq 0,05$) àquelas das plantas controle. A máxima recuperação foi
143 atingida com aproximadamente 914 h após o início do experimento, totalizando 38 dias
144 de experimento. A partir dos dados coletados pelo IRGA foram estimados: (i) déficit de
145 pressão de vapor (DPV), através da fórmula proposta por Buck [29].

146

147 2.3. Medidas de fluorescência da clorofila *a*

148 Concomitantemente às leituras de trocas gasosas, foram realizadas mensurações
149 para determinação da fluorescência da clorofila *a*. Para isso, foi escolhida e marcada uma
150 folha de cada indivíduo com características e condições semelhantes às utilizadas para as
151 leituras de trocas gasosas, as quais foram avaliadas com vistas na estimação dos
152 parâmetros de fotoproteção, *i.e.* eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m),
153 eficiência quântica efetiva do fotossistema II (Φ_{FSII}), razão F_v/F_0 , dissipação fotoquímica
154 (q_P) e dissipação não-fotoquímica (q_{NP}). Para tanto, cliques foliares foram utilizados para
155 aclimatação ao escuro por pelo menos 30 minutos, assim como descrito por Demmig-

156 Adams, Adams III [30]. As leituras foram realizadas por meio de um fluorômetro portátil
157 modelo FP 100 (Photon Systems Instruments, Drasov, Czech Republic) [31].

158

159 2.4. *Potencial osmótico foliar no amanhecer (Ψ_s)*

160 Para determinação do potencial osmótico foliar (Ψ_s), foram coletadas folhas
161 inteiras e saudáveis do terço médio da parte aérea da planta, entre 04:00 h e 04:30 h
162 (antemanhã), em três momentos ao longo do experimento: (i) antes do início do
163 tratamento, (ii) após 48 h de adição com NaCl e (iii) na completa recuperação, *i.e.*, 914 h
164 após o início do tratamento. As folhas foram identificadas e prontamente armazenadas
165 sob refrigeração (4 °C) por no máximo 24 h, quando o suco celular foi extraído e
166 centrifugado a 15.000 g por 10 minutos a 18 °C. Uma alíquota de 10 μ L do extrato
167 anteriormente descrito foi utilizada para a determinação da sua osmolalidade através de
168 um osmômetro de pressão de vapor (Vapro, mod 5600, Wescor, Inc., Logan, UT, USA)
169 [32]. A partir das equações propostas por Van't Hoff [33], a osmolalidade foi convertida
170 para potencial osmótico, dado em MPa, utilizando 1,8 como a constante de dissolução do
171 NaCl em água.

172

173 2.5. *Nutrientes foliares*

174 Folhas sadias do terço médio das plantas, foram coletadas no momento do estresse
175 máximo e no final da recuperação, identificados e levados à estufa (60 °C) por 72 h ou
176 até atingirem peso constante. Posteriormente, essas folhas foram trituradas em almofariz,
177 com auxílio de pistilo, e então realizado a determinação dos teores de sódio (Na^+),
178 potássio (K^+), cloreto (Cl^-), nitrogênio (N), fósforo (P), magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}),
179 segundo a metodologia proposta por Malavolta, Vitti [34].

180

181 2.6. Análises estatísticas

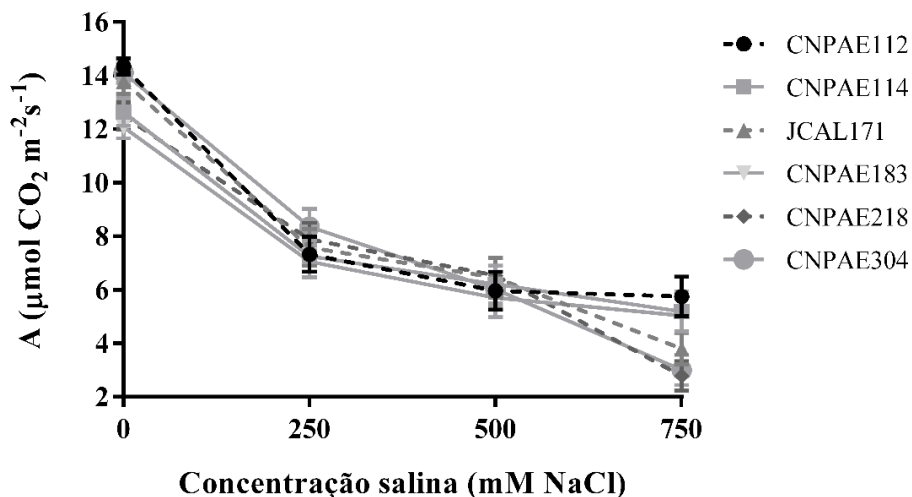
182 O experimento foi realizado em um delineamento em blocos casualizados, no qual
183 cada bloco constou de uma repetição com todos os tratamentos e genótipos, com um
184 arranjo fatorial (6 x 4), sendo seis genótipos, quatro níveis de salinidade e quatro
185 repetições (blocos). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância
186 (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de nível
187 de significância, ou teste T para a comparação entre duas concentrações salinas (0 mM e
188 750 mM de NaCl), através do software R [35].

189

190 3. Resultados

191 De forma geral, as plantas submetidas às concentrações de 250 e 500 mM de NaCl
192 não apresentaram sintomas visuais de toxicidade causados pelo estresse salino. Por outro
193 lado, as plantas submetidas a 750 mM, apresentaram sintomas de estresse por salinidade,
194 caracterizados por clorose nas folhas mais velhas, seguida por abscisão foliar logo após
195 o máximo estresse. Após queda das folhas velhas, a maioria dos genótipos apresentaram
196 rebrotamento foliar, com excessão das plantas dos genótipos CNPAE218 e CNPAE304,
197 as quais tiveram menor produção de folhas no período de recuperação, chegando a
198 apresentar necrose dos tecidos do caule (Figura S1).

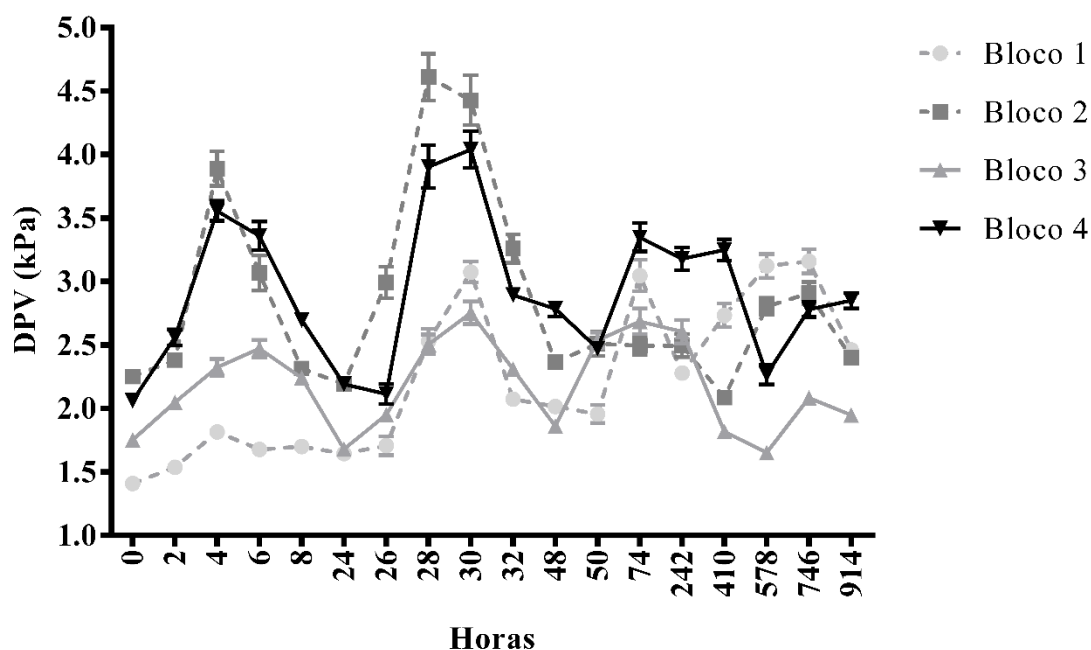
199 Todos os genótipos estudados apresentaram o mesmo comportamento, no que se
200 refere a taxa fotossintética, quando submetidos aos tratamentos de 250 mM e 500 mM de
201 NaCl (Figura 1). Neste sentido, a fim de compreender os diferentes comportamentos entre
202 os genótipos de *J. curcas* foram considerados somente os dados da maior concentração
203 salina, de forma a fazer um paralelo entre esta concentração e o tratamento controle,
204 isento de NaCl.



205

206 Figura 1. Taxa líquida de assimilação de CO_2 (A) de seis genótipos de *Jatropha curcas* em resposta a
 207 diferentes concentrações de NaCl (0, 250, 500 e 750 mM). Os valores são médias ($n = 70$) com erro padrão.

208 Os blocos apresentaram condições ambientais de temperatura e umidade
 209 diferentes entre si o que contribuiu para diferenciação nos dados de DPV (Figura 2). O
 210 período referente aos blocos 2 e 4 apresentaram maiores DPVs, principalmente nas
 211 primeiras 48 h de experimento, nos quais as plantas estavam sob o efeito da salinidade
 212 (Figura 2).



213

214 Figura 2. Déficit de pressão de vapor (DPV) ao longo do experimento em diferentes blocos. Os valores são
 215 médias ($n = 4$) com erro padrão.

216 A diferença e efetividade dos blocos também podem ser vistas na análise do teste
 217 F, o qual apresenta alta significância na maioria dos parâmetros avaliados (Tabela 2), com
 218 exceção de C_i/C_a , o qual não apresentou relação significativa entre blocos ao longo do
 219 experimento. Interação significativa ($p<0.05$), entre genótipos e tratamento salino, só foi
 220 observada para os dados de C_i/C_a no momento de máximo estresse, bem como para taxa
 221 fotossintética (A) e condutância estomática (g_s) ao final da recuperação.

222 Tabela 2. Nível de significância das variáveis estudadas, considerando o efeito isolado dos fatores bloco,
 223 genótipo (A), salinidade (B) e a interação (A x B) no máximo estresse (ME) e recuperação (RE).

Variáveis	Bloco		Genótipo (A)		Salinidade (B)		Interação (A x B)	
	ME	RE	ME	RE	ME	RE	ME	RE
A	**	**	ns	**	***	ns	ns	***
g_s	ns	*	ns	***	***	ns	ns	**
C_i/C_a	ns	ns	**	*	**	***	*	ns
Fv/Fm	***	***	ns	ns	***	**	ns	ns
Fv/Fo	***	**	ns	ns	***	ns	ns	ns
Φ_{FSII}	ns	***	ns	*	*	*	ns	ns
qNP	***	*	ns	ns	***	*	ns	ns
qP	***	***	ns	ns	**	ns	ns	ns
Ψ_s	**	**	ns	ns	***	ns	ns	ns
Cl^-	**	ns	ns	ns	***	***	ns	ns
Na^+	***	ns	**	ns	***	***	ns	ns
K^+	***	***	*	ns	*	***	ns	ns
Na^+/K^+	***	ns	ns	ns	***	**	ns	ns
N	*	***	**	ns	**	ns	ns	ns
P	***	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Mg^{2+}	**	**	**	*	***	ns	ns	ns
Ca^{2+}	***	***	ns	ns	**	ns	ns	ns

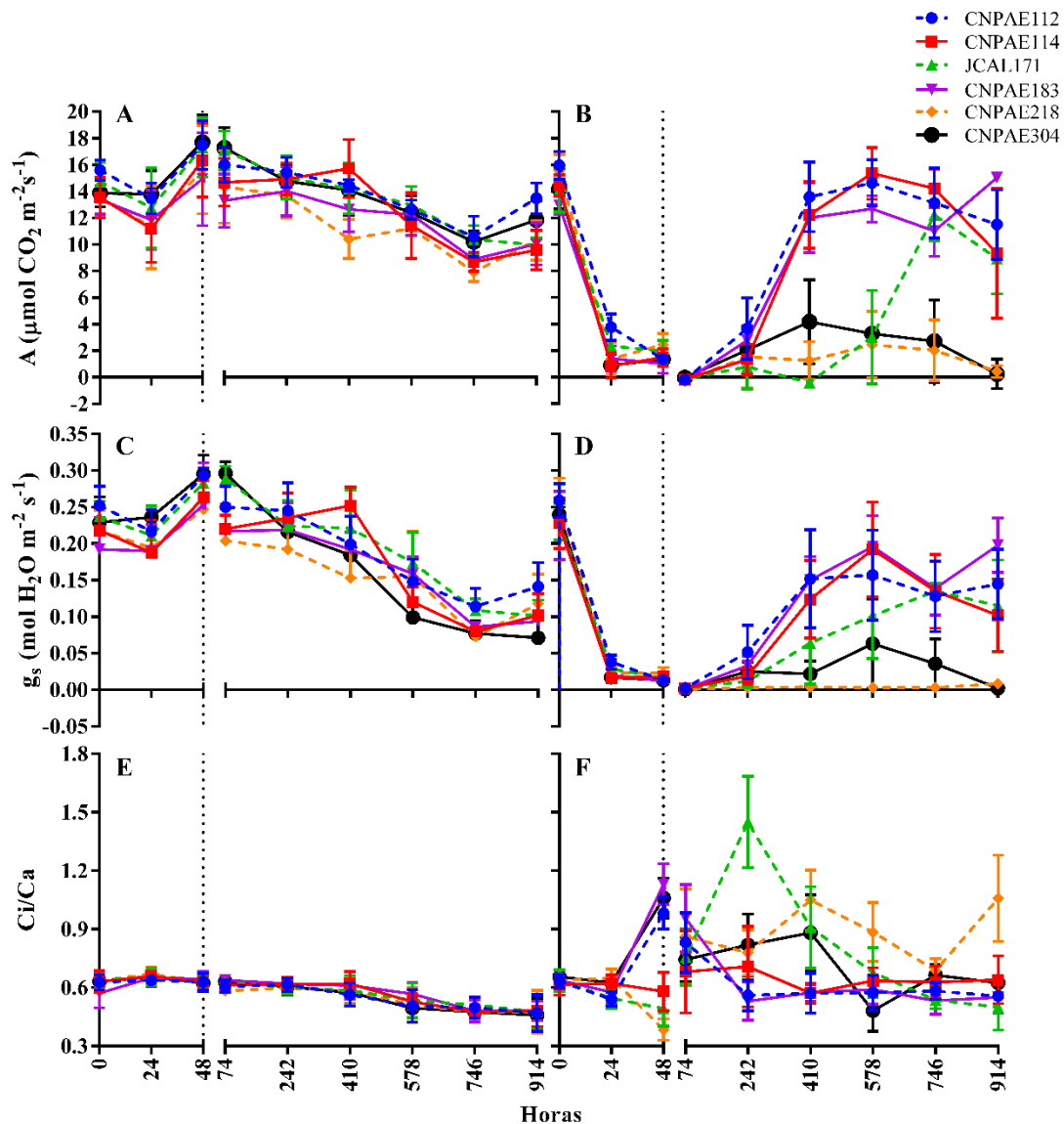
224 A = taxa líquida de assimilação de CO_2 por unidade de área; g_s = condutância estomática; C_i/C_a = razão
 225 entre a concentração externa e interna de CO_2 na câmara subestomática; Fv/Fm = eficiência quântica
 226 máxima do fotossistema II; Fv/Fo = razão entre a fluorescência variável e a inicial; Φ_{FSII} = eficiência
 227 quântica efetiva do fotossistema II; qNP = dissipação não-fotoquímica; qP = dissipação fotoquímica; Ψ_s =
 228 potencial osmótico foliar.

229 Significância (teste F): *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$; 'ns' = não significativo.

230

231 Nos parâmetros de trocas gasosas, houve redução na A em todos os genótipos com
 232 o aumento da condição salina (Figura 3 B), acompanhada de queda da g_s (Figura 3 D),
 233 quando comparados com as plantas do controle (Figura 3 A e 3 C). Essas alterações
 234 ocorreram desde as primeiras horas da inclusão de sal ao substrato, atingindo o máximo
 235 estresse com 48 h do início da diferenciação dos tratamentos. A razão C_i/C_a apresentou
 236 comportamentos intraespecíficos distintos. No máximo estresse, os genótipos

237 CNPAE112, CNPAE183 e CNPAE304, apresentaram uma elevação significativa da
 238 razão C_i/C_a com valores de $1,20 \pm 0,33$, $1,13 \pm 0,34$ e $1,06 \pm 0,55$, respectivamente
 239 (Figura 3 F). Perfil diferente foi observado nos genótipos CNPAE114 e JCAL171, os
 240 quais mantiveram os valores de C_i/C_a semelhantes aos registrados antes do máximo
 241 estresse, assim como CNPAE218, o qual apresentou uma redução nesse valor, com média
 242 de $0,46 \pm 0,07$.



243

244 Figura 3. Taxa líquida de assimilação de CO_2 (A) (A e B), condutância estomática (g_s) (C e D) e razão entre
 245 a concentração externa e interna de CO_2 na câmara subestomática (C_i/C_a) (E e F) de plantas jovens de seis
 246 genótipos de *Jatropha curcas* sem condição salina (A, C e E) e submetido à 750 mM NaCl (B, D e F).
 247 Horas: 0, momento anterior à aplicação do sal; 48 horas, máximo estresse (linha pontilhada vertical); 74 à
 248 914, último dia de recuperação. Os valores são médias ($n = 4$) com erro padrão.

249 No período de recuperação, as plantas dos genótipos CNPAE112, CNPAE114 e
250 CNPAE183 submetidas à salinidade alcançaram taxas fotossintéticas próximas aos
251 valores registrados no tratamento controle após 410 h de experimento (Figura 3 B),
252 acompanhada pelo aumento da g_s (Figura 3 C e D). O genótipo JCAL171 apresentou uma
253 recuperação mais lenta, atingindo valores semelhantes ao controle somente após 746 h.
254 Por outro lado, os genótipos CNPAE304 e CNPAE218 não mostraram recuperação das
255 suas taxas fotossintéticas bem como da g_s , mesmo após 35 dias da retirada da condição
256 salina do substrato.

257 Com a retomada das taxas fotossintéticas e da condutância estomática na
258 recuperação, os valores de C_i/C_a apresentaram valores semelhantes aos apresentados
259 pelas plantas controle após o máximo estresse nos genótipos CNPAE183 e CNPAE112
260 (Figura 3 E e F). Em JCAL171 e CNPAE304 essa recuperação nos níveis de CO_2
261 subestomático só pôde ser observado nas leituras realizadas com 410 h e 578 h,
262 respectivamente. Mesmo após 35 dias de recuperação, o genótipo CNPAE218 apresentou
263 elevados valores de C_i/C_a ($0,94 \pm 0,15$), sendo significativamente maiores quando
264 comparados aos outros genótipos.

265 Os parâmetros de fluorescência também foram afetados pela presença de sal
266 (Tabela 3). Nesse sentido, F_v/F_m e F_v/F_0 não foram diferencialmente significativas entre
267 genótipos, porém as plantas submetidas à salinidade mostraram uma diminuição de
268 2,4 % e 15,4 % para cada variável respectivamente. Na recuperação, as plantas
269 submetidas a salinidade mostraram uma pequena melhora em ambos os parâmetros,
270 mesmo tendo permanecido com razões relativamente menores, quando comparadas as
271 plantas controle (Tabela 3).

272 Essa menor eficiência de conversão de elétrons em energia fotoquímica foi, de
273 fato, impactada no rendimento fotoquímico do fotossistema II (Φ_{FSII}), o qual foi

274 diminuído em ~15 % mediante estresse (Tabela 3). Dessa forma, as plantas submetidas à
275 salinidade apresentaram, no máximo estresse, uma elevação na dissipação de energia não
276 fotoquímica (qNP) na ordem de 153 %, a qual reduziu drasticamente (55 %) em favor das
277 plantas na fase da recuperação. Essa redução denota que as plantas tiveram condições de
278 se recuperar, mas essa recuperação só não foi completa porque em alguns genótipos (*e.g.*
279 CNPAE112, CNPAE114, CNPAE218 e CNPAE304) a diferença entre as médias obtidas
280 pelas plantas controle e as supostamente recuperadas atingiram valores altos, enquanto
281 que nos genótipos JCAL171 e CNPAE183 praticamente não houve diferença significativa
282 entre os valores mostrados pelas plantas controle e estressadas (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros da fluorescência da clorofila a de seis genótipos de *J. curcas* submetidos a 750 mM (estresse) e sem sal (controle) na fase de máximo estresse (ME) e recuperação (RE).

			CNPAE112	CNPAE114	JCAL171	CNPAE183	CNPAE218	CNPAE304	
Fv/Fm	ME	Controle	0.83 ± 0.01	0.82 ± 0.02	0.82 ± 0.02	0.82 ± 0.02	0.82 ± 0.01	0.82 ± 0.02	0.82 ± 0.01 a
		Estresse	0.80 ± 0.02	0.79 ± 0.01	0.80 ± 0.03	0.80 ± 0.03	0.80 ± 0.03	0.78 ± 0.03	0.80 ± 0.01 b
			0.81 ± 0.01 A	0.80 ± 0.02 A	0.81 ± 0.02 A	0.81 ± 0.01 A	0.81 ± 0.01 A	0.80 ± 0.03 A	
	RE	Controle	0.84 ± 0.01	0.84 ± 0.01	0.84 ± 0.01	0.81 ± 0.01	0.83 ± 0.01	0.83 ± 0.01	0.83 ± 0.03 a
		Estresse	0.80 ± 0.04	0.81 ± 0.02	0.80 ± 0.02	0.82 ± 0.01	0.75 ± 0.05	0.76 ± 0.06	0.79 ± 0.04 b
			0.82 ± 0.03 A	0.82 ± 0.02 A	0.82 ± 0.02 A	0.82 ± 0.04 A	0.79 ± 0.04 A	0.80 ± 0.04 A	
qP	ME	Controle	0.57 ± 0.05	0.51 ± 0.11	0.52 ± 0.07	0.51 ± 0.11	0.52 ± 0.09	0.50 ± 0.08	0.52 ± 0.07 b
		Estresse	0.65 ± 0.05	0.59 ± 0.05	0.62 ± 0.05	0.66 ± 0.05	0.55 ± 0.06	0.59 ± 0.07	0.61 ± 0.05 a
			0.61 ± 0.05 A	0.55 ± 0.08 A	0.61 ± 0.03 A	0.58 ± 0.08 A	0.49 ± 0.05 A	0.55 ± 0.05 A	
	RE	Controle	0.42 ± 0.06	0.43 ± 0.11	0.32 ± 0.07	0.55 ± 0.11	0.51 ± 0.13	0.45 ± 0.11	0.56 ± 0.12 a
		Estresse	0.46 ± 0.15	0.50 ± 0.10	0.36 ± 0.15	0.51 ± 0.02	0.46 ± 0.08	0.48 ± 0.05	0.54 ± 0.12 a
			0.54 ± 0.12 A	0.59 ± 0.12 A	0.47 ± 0.14 A	0.57 ± 0.08 A	0.58 ± 0.10 A	0.55 ± 0.10 A	
qNP	ME	Controle	0.62 ± 0.12	0.58 ± 0.15	0.82 ± 0.17	0.67 ± 0.18	0.57 ± 0.13	0.59 ± 0.15	0.66 ± 0.13 b
		Estresse	1.17 ± 0.26	1.48 ± 0.17	1.63 ± 0.35	1.61 ± 0.56	2.36 ± 0.32	1.75 ± 0.30	1.67 ± 0.35 a
			0.89 ± 0.23 B	1.03 ± 0.27 AB	1.22 ± 0.33 AB	1.14 ± 0.46 AB	1.53 ± 0.49 A	1.17 ± 0.32 AB	
	RE	Controle	0.79 ± 0.09	1.12 ± 0.20	0.70 ± 0.04	0.55 ± 0.12	0.59 ± 0.13	0.79 ± 0.08	0.69 ± 0.11 b
		Estresse	1.56 ± 0.76	2.09 ± 0.12	0.71 ± 0.20	0.59 ± 0.12	2.01 ± 0.77	1.57 ± 0.92	1.07 ± 0.45 a
			0.76 ± 0.07 A	1.28 ± 0.33 A	0.72 ± 0.08 A	0.53 ± 0.09 A	1.10 ± 0.52 A	0.97 ± 0.50 A	
Fv/F0	ME	Controle	4781 ± 97	4639 ± 98	4704 ± 229	4510 ± 141	4728 ± 166	4699 ± 361	4677 ± 48 a
		Estresse	4124 ± 264	3758 ± 235	3937 ± 160	3977 ± 230	4136 ± 151	3801 ± 434	3955 ± 100 b
			4452 ± 180 A	4198 ± 204 A	4321 ± 194 A	4244 ± 160 A	4432 ± 132 A	4250 ± 264 A	
	RE	Controle	5566 ± 911	4781 ± 212	4663 ± 261	4442 ± 261	4946 ± 216	5393 ± 1001	4965 ± 227 a
		Estresse	4752 ± 1108	4875 ± 1139	4048 ± 296	4760 ± 250	2470 ± 335	4446 ± 1662	4225 ± 388 a
			5159 ± 682 A	4828 ± 537 A	4356 ± 216 A	4601 ± 178 A	3708 ± 503 A	4919 ± 916 A	
Φ _{FSII}	ME	Controle	0.36 ± 0.02	0.28 ± 0.04	0.33 ± 0.06	0.28 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.34 ± 0.01	0.31 ± 0.02 a
		Estresse	0.34 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.30 ± 0.05	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.04	0.27 ± 0.01 b
			0.35 ± 0.01 A	0.27 ± 0.02 AB	0.30 ± 0.03 AB	0.29 ± 0.03 AB	0.25 ± 0.02 B	0.28 ± 0.03 AB	
	RE	Controle	0.26 ± 0.03	0.25 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.39 ± 0.08	0.38 ± 0.08	0.29 ± 0.05	0.30 ± 0.03 a
		Estresse	0.25 ± 0.06	0.19 ± 0.04	0.24 ± 0.09	0.34 ± 0.01	0.20 ± 0.04	0.26 ± 0.06	0.25 ± 0.02 b
			0.26 ± 0.03 AB	0.22 ± 0.03 B	0.23 ± 0.04 B	0.37 ± 0.04 A	0.29 ± 0.06 AB	0.27 ± 0.04 AB	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem significativamente entre genótipos pelo teste de Student Newman Keuls ($p < 0.05$), e letras minúsculas comparam tratamentos salinos pelo teste T ($p < 0.05$), ambos na mesma fase.

283 No máximo estresse, os genótipos apresentaram diferença significativa entre si
284 apenas para os parâmetros nutricionais, no que diz respeito aos teores de Na^+ , K^+ , N e
285 Mg^{2+} (Tabela 4). Dessa maneira, foi possível observar que os genótipos CNPAE304 e
286 CNPAE183 foram os mais contrastantes, pois há um maior acúmulo de Na^+ (66,5 %) no
287 genótipo CNPAE304 em relação à CNPAE183. Essa baixa concentração de Na^+ em
288 CNPAE183 contribuiu para esse genótipo apresentar os menores valores da razão Na^+/K^+
289 (0,40), mesmo não sendo significativamente diferente com os outros genótipos.

290 É notório informar que no momento da recuperação, o nível de todos os nutrientes
291 foi distinto daquele obtido no momento de máximo estresse; uma vez que, independente
292 do genótipo avaliado, os níveis de K^+ , N e P foram significativamente aumentados na
293 recuperação em comparação às plantas sob salinidade. Outros minerais, como Cl^- , Na^+ e
294 Ca^{+2} foram diminuídos na recuperação, enquanto que Mg^{+2} se manteve estável (Tabela
295 4).

296
297Tabela 4. Variáveis nutricionais de seis genótipos de *J. curcas* submetido à 750 mM NaCl no máximo estresse (ME) e ao final da recuperação (RE), independente do tratamento salino.

	Nutrientes (g kg ⁻¹ peso seco)	CNPAE112	CNPAE114	JCAL171	CNPAE183	CNPAE218	CNPAE304
ME	Cl ⁻	18.49 ± 5.60 ns	19.84 ± 5.61 ns	19.89 ± 5.82 ns	19.39 ± 4.96 ns	23.08 ± 6.61 ns	22.66 ± 7.02 ns
	Na ⁺	13.49 ± 2.69 a	11.96 ± 2.17 ab	11.36 ± 2.02 ab	9.07 ± 1.08 b	14.07 ± 2.46 a	15.10 ± 2.75 a
	K ⁺	18.94 ± 1.52 ab	21.25 ± 2.66 ab	17.58 ± 1.55 b	24.75 ± 2.37 ab	24.50 ± 2.62 ab	25.44 ± 3.24 a
	Na ⁺ /K ⁺	0.75 ± 0.18 ns	0.66 ± 0.18 ns	0.73 ± 0.17 ns	0.40 ± 0.07 ns	0.62 ± 0.12 ns	0.68 ± 0.16 ns
	N	39.46 ± 1.04 a	38.03 ± 1.25 a	36.73 ± 1.10 a	33.72 ± 0.81 b	37.99 ± 1.14 a	38.48 ± 1.57 a
	P	5.15 ± 0.42 ns	4.77 ± 0.29 ns	5.20 ± 0.25 ns	5.16 ± 0.38 ns	4.96 ± 0.40 ns	4.85 ± 0.25 ns
	Mg ²⁺	5.01 ± 0.54 ab	5.90 ± 0.30 a	5.65 ± 0.34 a	4.75 ± 0.19 ab	5.40 ± 0.47 a	3.99 ± 0.59 b
	Ca ²⁺	23.52 ± 3.95 ns	23.74 ± 3.36 ns	22.54 ± 3.29 ns	23.42 ± 4.54 ns	23.17 ± 5.70 ns	22.89 ± 4.68 ns
RE	Cl ⁻	10.18 ± 2.35 ns	10.16 ± 2.30 ns	11.14 ± 3.06 ns	8.60 ± 1.12 ns	9.07 ± 3.32 ns	7.15 ± 2.07 ns
	Na ⁺	11.52 ± 3.35 ns	9.89 ± 1.92 ns	9.22 ± 1.12 ns	8.43 ± 1.29 ns	7.02 ± 0.93 ns	5.96 ± 0.98 ns
	K ⁺	26.50 ± 3.43 ns	28.63 ± 4.18 ns	22.06 ± 2.49 ns	27.04 ± 4.63 ns	28.33 ± 3.23 ns	28.92 ± 4.97 ns
	Na ⁺ /K ⁺	0.55 ± 0.20 ns	0.52 ± 0.22 ns	0.42 ± 0.04 ns	0.35 ± 0.06 ns	0.27 ± 0.05 ns	0.17 ± 0.05 ns
	N	44.05 ± 1.97 ns	43.86 ± 1.95 ns	46.44 ± 0.95 ns	45.05 ± 2.02 ns	41.39 ± 2.53 ns	44.63 ± 2.76 ns
	P	6.82 ± 0.49 ns	5.57 ± 0.26 ns	5.72 ± 0.28 ns	6.58 ± 0.15 ns	5.73 ± 0.44 ns	6.69 ± 0.89 ns
	Mg ²⁺	5.48 ± 0.47 a	4.45 ± 0.40 ab	5.46 ± 0.41 a	4.10 ± 0.49 ab	3.85 ± 0.33 ab	4.16 ± 0.38 ab
	Ca ²⁺	12.69 ± 3.34 ns	16.53 ± 3.22 ns	20.57 ± 3.50 ns	18.02 ± 2.44 ns	17.18 ± 5.65 ns	19.79 ± 5.03 ns

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre genótipos pelo teste de Student Newman Keuls (p <0.05), para mesma variável; 'ns' = não significativo.

298 Comparando as plantas estressadas e as plantas controle, independente dos
 299 genótipos, verifica-se que os níveis de Cl^- , Na^+ e Ca^{2+} foram respectivamente acrescidos
 300 em 507,6 %, 95,1 % e 40 % nas plantas estressadas em comparação as plantas controle.
 301 Por outro lado, os níveis de K^+ e N foram respectivamente reduzidos em 15,6 % e 6,2 %
 302 nas plantas estressadas em comparação as do controle (Tabela 5).

303 Dentre os parâmetros analisados, o potencial osmótico foi um dos mais alterados
 304 com o estresse, uma vez que independentemente do genótipo avaliado, as plantas
 305 estressadas apresentaram o potencial osmótico 1,27 vezes menor do que o potencial
 306 osmótico das plantas controle (Tabela 5).

307 Tabela 5. Potencial osmótico e variáveis nutricionais de plantas jovens de *J. curcas* submetidas à 750 mM
 308 NaCl (estresse) e sem adição de sal (controle) no máximo estresse, independente do genótipo.

Variável	Control	Estresse
MPa Ψ_s	-1.91 ± 0.05 a	-2.42 ± 0.06 b
Cl^-	5.81 ± 0.53 b	35.30 ± 1.67 a
Na^+	8.48 ± 0.62 b	16.54 ± 1.29 a
K^+	23.94 ± 1.63 a	20.21 ± 1.17 b
Na^+/K^+	0.40 ± 0.05 b	0.88 ± 0.09 a
N	38.58 ± 0.75 a	36.22 ± 0.66 b
Mg^{2+}	4.63 ± 0.21 b	5.60 ± 0.28 a
Ca^{2+}	19.34 ± 2.28 b	27.08 ± 2.23 a

309 Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre tratamentos salinos pelo teste T
 310 ($p < 0.05$) para a mesma variável.

311

312 4. Discussão

313 Os parâmetros de trocas gasosas dos genótipos de *J. curcas*, estudados no presente
 314 trabalho, foram reduzidos pela adição de NaCl na solução nutritiva desde as primeiras
 315 horas de tratamento. As plantas submetidas a 750 mM de NaCl apresentaram redução nos
 316 parâmetros de g_s e A até o momento de máximo estresse. Esse declínio no comportamento
 317 fisiológico está relacionado como uma resposta imediata da planta frente ao déficit
 318 hídrico imposto pela alta concentração salina, uma vez que a presença de sal na solução

319 de solo reduz o potencial hídrico do solo [3]. O fechamento estomático, é uma estratégia
320 que permite reduzir a perda excessiva de água através da transpiração, favorece a
321 manutenção do *status* hídrico da planta [36], além de reduzir o fluxo de íons [4, 17, 37]
322 do substrato para a parte aérea [38], prevenindo danos relacionados ao efeito citotóxico
323 promovido pelo acúmulo excessivo de, principalmente, Na^+ e Cl^- [39]. Por outro lado, o
324 fechamento estomático reduz o aporte de CO_2 para o interior da câmara subestomática,
325 explicando a diminuição das taxas fotossintéticas, como observado desde as primeiras
326 horas do tratamento salino. A redução na disponibilidade e fixação de CO_2 compromete
327 a segunda etapa da fotossíntese e o fornecimento de ADP e NADP^+ , utilizadas na fase
328 fotoquímica. Dessa forma, quando ocorre uma redução no aporte de CO_2 sem que ocorra
329 paralelamente uma diminuição na disponibilidade de energia luminosa, evidencia-se um
330 aumento na suscetibilidade da planta ao dano fotoquímico, induzindo fortes perturbações
331 na reação fotoquímica [24] e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) decorrente
332 da menor disponibilidade de NADP^+ como receptor final de elétron [40].

333 Frente ao déficit hídrico, imposto pela presença de sal no substrato [41], as plantas
334 de *J. curcas* reduziram seu potencial osmótico, favorecendo a absorção de água, fato
335 anteriormente também relatado por diversos autores nesta mesma espécie [17, 42, 43], o
336 que corrobora com os dados apresentados neste estudo. Com a retirada da condição salina
337 do substrato, o potencial osmótico não diferiu entre os tratamentos. A redução do
338 potencial osmótico (Ψ_s) para espécies lenhosas é reconhecida como um mecanismo para
339 suportar os efeitos do estresse salino e minimizar o déficit hídrico. Esse ajustamento
340 osmótico favorece a captação de água pelas raízes e pode ser atribuído à síntese ou
341 translocação de substâncias ou íons os quais podem atuar como osmorreguladores,
342 incluindo cátions e ânions, presentes na própria solução salina como Na^+ e Cl^- ou
343 encontrados nas folhas [4, 44].

344 Efeitos adversos na fisiologia e metabolismo das plantas, decorrentes da
345 exposição ao NaCl, são causados, principalmente, pelo efeito citotóxico dos íons Na^+ e
346 Cl^- em elevadas concentrações e alteração no balanço nutricional [41]. Confirmando os
347 estudos já descritos na literatura, com a aplicação da solução salina no substrato, as
348 plantas submetidas a 750 mM de NaCl absorveram grande quantidade desses íons da
349 solução de solo, chegando a apresentar um acréscimo de ~508 % na $[\text{Cl}^-]$ nas plantas
350 estressadas, o que possivelmente ocasionou os sintomas visuais de toxicidade
351 caracterizados pela clorose nas folhas mais velhas, seguida por abscisão foliar. A elevada
352 concentração de íons Cl^- nas folhas pode causar danos relacionados à degradação das
353 moléculas de clorofila, acarretando danos nos fotossistemas [45], o que ajuda a
354 compreender a queda das taxas fotossintéticas e danos ao aparato fotossintético de alguns
355 genótipos estudados.

356 O acúmulo de Na^+ nas folhas dos genótipos no período de máximo estresse
357 revelou um importante indicativo do comportamento dos genótipos frente ao estresse
358 salino. Dessa forma, o genótipo CNPAE183 apresentou maior sucesso na seletividade
359 iônica, evitando o acúmulo de Na^+ nas folhas, o que pode ter auxiliado na proteção do
360 metabolismo enzimático [46]. Além dos efeitos deletérios, o aumento no teor de Na^+
361 promove redução na absorção de K^+ pelas plantas em função da competição do sódio pelo
362 carregador de potássio, principalmente por uma similaridade existente entre o raio iônico
363 desses íons [6]. Esse comportamento foi observado nas plantas de pinhão-manso desse
364 estudo e comprovado pela análise da relação desses cátions, o qual revelou um aumento
365 na razão Na^+/K^+ nas plantas submetidas à salinidade, evidenciando uma maior absorção
366 e translocação de sódio para as folhas, em detrimento do potássio [47].

367 É sabido que a análise da razão Na^+/K^+ muitas vezes é mais importante do que a
368 análise individual dos nutrientes, também devido aos efeitos na regulação da atividade de

369 várias enzimas tanto do metabolismo primário quanto secundário. Neste sentido, uma
370 menor razão Na^+/K^+ é considerada como uma marca de tolerância para plantas submetidas
371 à salinidade, fato comprovado em inúmeros estudos, inclusive com *J. curcas* [4, 48-51].
372 De acordo com Greenway and Munns [49], plantas glicófitas, como *J. curcas* devem
373 apresentar razão Na^+/K^+ igual ou menor do que 0,6 para que a planta consiga manter a
374 eficiência metabólica, sem danos nutricionais. Baseado nos argumentos que uma menor
375 razão Na^+/K^+ é um melhor indicativo de tolerância à salinidade e que plantas,
376 apresentando uma razão Na^+/K^+ inferior a 0,6, são mais eficientes metabolicamente,
377 sugere-se que o genótipo CNPAE183 apresenta maior capacidade de seletividade iônica,
378 favorecendo o equilíbrio metabólico, quando comparado com os genótipos testados neste
379 estudo. Após 35 dias de recuperação, todos os genótipos reduziram os valores da relação
380 Na^+/K^+ , atingindo médias que permitem a manutenção adequada do metabolismo. Essa
381 redução pode ser explicada pelo incremento dos teores de K^+ , absorvido durante estes 35
382 dias, ou pela redução da concentração de Na^+ , eliminado pela queda de folhas velhas ou
383 em função do efeito de diluição como mencionado por Rosolem [52], uma vez que a
384 planta continua apresentando crescimento.

385 Mesmo que na recuperação as plantas submetidas à salinidade tenham reduzido
386 significativamente seus níveis de Cl^- e Na^+ , os valores apresentados ainda são elevados,
387 uma evidência circunstancial de que a queda de folhas velhas não foi suficiente para
388 retirada do excesso destes íons das plantas após o estresse, mesmo após 35 dias de
389 recuperação. Cumpre ressaltar, ainda, que o genótipo CNPAE183 mostrou a menor queda
390 nos níveis de Cl^- e Na^+ em relação aos demais acessos, provavelmente pelo fato deste
391 genótipo já ter mostrado os menores valores destes íons quando no máximo estresse.

392 A presença de NaCl no substrato pode inibir a absorção de Ca^{+2} pelas plantas [6,
393 53] uma vez que altas concentrações de Na^+ inibe a absorção de Ca^{+2} devido,

394 principalmente a inibição não competitiva entre esses cátions [54] quando estes se
395 encontram em grandes concentrações no substrato. Neste estudo não se verificou tal
396 comportamento, uma vez que a presença da solução nutritiva fez elevar a concentração
397 foliar de Ca^{2+} , mensageiro químico do fechamento estomático mediado por ácido
398 abscísico. Desta maneira, assim como o fósforo, a presença do cálcio e do magnésio
399 fornecido pela solução nutritiva, possivelmente, foi requerido para minimizar os efeitos
400 salinos nas plantas de pinhão-manso. Autores já evidenciam que a suplementação de
401 cálcio no substrato pode promover a redução dos efeitos nocivos da salinidade devido ao
402 aumento do influxo de Ca^{2+} pela planta, em detrimento do Na^+ , diminuindo assim, a
403 relação Na^+/K^+ [55].

404 Após o máximo estresse, os genótipos apresentaram distintos comportamentos em
405 relação as taxas fotossintéticas. Essa diferença se mostrou através das diferentes
406 velocidades de recuperação, o que pode indicar uma variação intraespecífica e um forte
407 indício para seleção de um genótipo mais tolerante [56]. Alguns trabalhos [57, 58] tem
408 mostrado que genótipos mais sensíveis tendem a apresentar uma retomada mais lenta dos
409 parâmetros fisiológicos, quando comparada a genótipos mais tolerantes. Neste sentido,
410 postula-se que uma completa recuperação das taxas fotossintéticas, após aplicação do
411 estresse, seja um forte indício de que a salinidade não prejudicou significativamente o
412 aparato fotoquímico [36, 59] ou que as redes regulatórias de proteção foram mais ativas.
413 Nestas redes, determinadas proteínas reguladoras têm papel fundamental na ativação ou
414 desativação de mecanismos moleculares que culminam em processos fisiológicos
415 determinantes da tolerância ou sensibilidade ao estresse por salinidade.

416 Partindo desse pressuposto, acredita-se que os genótipos CNPAE183,
417 CNPAE112, CNPAE114 e JCAL171, foram mais eficientes, apresentando maior
418 tolerância ao estresse salino do que os genótipos CNPAE218 e CNPAE304. Essa

419 distinção categórica entre os genótipos avaliados se deve ao fato destes últimos não terem
420 recuperado suas taxas fotossintéticas mesmo após a retirada da condição estressante,
421 comprometendo o crescimento e produção de biomassa, evidenciado pela supressão de
422 novas folhas e necrose dos tecidos do caule. Tais observações indicam fortemente a
423 influência de variações genéticas específicas na expressão de fenótipo mais tolerantes ou
424 sensíveis à salinidade nesta espécie, nas interações com fatores abióticos.

425 Fatores ambientais, como altos valores de DPV, podem desencadear danos
426 fotoquímicos nas folhas [21], uma vez que está diretamente relacionado com a
427 temperatura e umidade do ar. Partindo desse pressuposto, pode-se inferir que a não
428 recuperação dos genótipos CNPAE218 e CNPAE304 possa estar relacionada a sua menor
429 eficiência de dissipação de calor latente, efeito que foi fatal em dois dos quatro blocos
430 avaliados, nos quais o DPV registrado no momento da avaliação das trocas gasosas foi
431 de 3.5 e 4.6 kPa).

432 Mesmo apresentando uma redução na g_s , alguns genótipos como CNPAE112,
433 CNPAE183 e CNPAE304 mostraram valores elevados na razão C_i/C_a . Sabe-se que em
434 condição de estresse, a concentração interna de carbono (C_i) aumenta, devido ao
435 direcionamento do CO_2 proveniente da respiração para a câmara subestomática [60].
436 Problemas na maquinaria fotossintética [61, 62] ou uso de cristais de oxalato de cálcio
437 ($CaOx$) como forma de manutenção de CO_2 interno, podem ter contribuído para a
438 elevação da razão C_i/C_a [63] e, em alguns genótipos, promover uma velocidade maior de
439 recuperação das taxas fotossintéticas. Cumpre ressaltar que mesmo com uma queda
440 expressiva das taxas fotossintéticas sob estresse salino, a razão C_i/C_a raramente diminuiu
441 de 0,5, uma forte evidência de que não foi o fechamento estomático a principal causa da
442 diminuição das taxas fotossintéticas [64]. Outros fatores podem ter levado ao declínio das
443 taxas fotossintéticas; dentre estes pode-se citar: (i) danos no aparato fotossintético e ao

444 ciclo de Calvin [65-69], (ii) diminuição da condutância mesofílica [70, 71] e (iii) redução
445 da taxa de transporte de elétrons entre os fotossistemas [72, 73], fatores estes que podem
446 diminuir ou retardar a velocidade de utilização do carbono interno.

447 Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* se alteram em resposta aos estresses
448 abióticos, como a salinidade [31], e tem se mostrado uma importante variável na
449 determinação de tolerância de genótipos [25], pois a alteração da estabilidade nesses
450 parâmetros vem sendo tratada como um dos efeitos primários da salinidade sobre as taxas
451 fotossintéticas, em plantas sensíveis ao estresse. Todos os dados de fluorescência da
452 clorofila *a* mensurados neste estudo mostram uma tendência de redução na eficiência do
453 fotossistema II em todos os genótipos, no máximo estresse, quando comparado ao
454 controle, sendo essa diferença mais sensível na recuperação. Sabe-se que folhas saudáveis
455 devem apresentar uma razão F_v/F_m igual ou superior a 0,80 [31, 74, 75]; onde valores
456 abaixo deste podem indicar danos no aparato fotossintético e fotoinibição do centro de
457 reação do PSII [76]. A redução razão F_v/F_m durante a aplicação do NaCl nos genótipos
458 CNPAE218 e CNPAE304 para 0,75 e 0,76, respectivamente, acoplado a elevação na
459 razão C_i/C_a são evidências circunstanciais que suportam a hipótese de que fatores não
460 estomáticos são responsáveis pela queda da fotossíntese após o período de estresse [77]
461 nesses genótipos. Entretanto, a razão F_v/F_0 , que é mais sensível do que a razão F_v/F_m
462 uma vez que mostra uma maior amplitude [76, 78], pode revelar um maior efeito
463 fotoinibitório nas plantas sob estresse. A elevação de qP das plantas submetidas ao
464 estresse salino foi uma característica importante mostrada neste estudo. Esse
465 comportamento, aliado a redução dos parâmetros de trocas gasosas como g_s e A , bem
466 como ao aumento da concentração interna de carbono reforça a ideia de que vias
467 alternativas de obtenção de energia, principalmente a fotorrespiração pode estar sendo
468 utilizada pelos genótipos CNPAE218 e CNPAE304. A curto prazo, a via fotorrespiratória

469 pode atuar como uma rota alternativa para dissipação de energia e proteção contra estresse
470 [79]; porém, a longo prazo, o O₂ metabolizado, pelo aumento da fotorrespiração, exige
471 uma alta demanda energética e diminui o ganho líquido de carbono, além de promover a
472 formação de EROs [79], podendo comprometer o desenvolvimento da planta e morte de
473 tecidos, como observado nesse trabalho com estes mesmos genótipos.

474 Baseado nos dados fisiológicos, fotoprotetores e nutricionais pode-se concluir que
475 os genótipos CNPAE112, CNPAE114 e CNPAE183 apresentam-se como potenciais
476 candidatos mais tolerantes à salinidade, mostrando rápida recuperação das taxas
477 fotossintéticas e de crescimento quando o NaCl é retirado do sistema. Por outro lado, a
478 concentração de 750 mM de NaCl mostrou-se letal para os genótipos CNPAE218 e
479 CNPAE304, sendo assim, esses genótipos se mostram mais sensíveis que os demais, ou
480 ainda, parecem não possuir os mecanismos moleculares de regulação gênica e metabólica
481 que viabilizam a recuperação fisiológica adequada após o estresse máximo por salinidade.
482 O genótipo JCAL171 apresenta uma tolerância moderada, verificada através da
483 capacidade de se recuperar de forma lenta depois de submetido às condições severas de
484 salinidade, podendo ser considerado como moderadamente tolerante (provável presença
485 de mecanismos intermediários de regulação gênica e metabólica, promotores da
486 tolerância à salinidade). Diante do exposto, mostra-se que diferentes genótipos de pinhão-
487 manso apresentam respostas e sensibilidade variada quando submetidos ao estresse
488 salino. Estudos como estes, aliados a identificações de vias de regulações gênicas podem
489 auxiliar a compreender as diferentes vias de regulação entre genótipos sob estresse salino.

490

491 **Agradecimentos**

492 Os autores agradecem o suporte financeiro ao Conselho Nacional de Desenvolvimento
493 Científico e Tecnológico - CNPq (404357/2013-0) pelo suporte financeiro. A primeira

494 autora agradece à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco –
 495 FACEPE (IBPG – 0709-2.07/13) pela concessão da bolsa. Agradecemos especialmente
 496 ao Dr. Agnaldo Rodrigues de Melo Chaves, Empresa Brasileira de Pesquisa
 497 Agropecuária, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, Brasil e a Embrapa Agroenergia,
 498 Brasília, DF, Brasil pelo fornecimento das sementes usadas nesse trabalho.

499

500 Referências

- 501 [1] Rahdari P, Hoseini SM. Salinity stress: A review. *Tech J Engin & App Sci.*
 502 2011;1(1):63-6.
- 503 [2] Wang WY, Yan XF, Jiang Y, Qu B, Xu YF. Effects of salt stress on water content
 504 and photosynthetic characteristics in *Iris lactea* var. *chinensis* seedlings. *Middle East J*
 505 *Sci Res.* 2012;12(1):70-4.
- 506 [3] Parihar P, Singh S, Singh R, Singh VP, Prasad SM. Effect of salinity stress on plants
 507 and its tolerance strategies: a review. *Environ Sci Pollut Res.* 2015;22(6):4056-75.
- 508 [4] Silva EN, Silveira JAG, Rodrigues CRF, Viégas RA. Physiological adjustment to
 509 salt stress in *Jatropha curcas* is associated with accumulation of salt ions, transport and
 510 selectivity of K⁺, osmotic adjustment and K⁺/Na⁺ homeostasis. *Plant Biol.*
 511 2015;17(1):1023-9.
- 512 [5] Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress:
 513 Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot.* 2009;103(4):551-60.
- 514 [6] Willadino L, Camara TR. Tolerância das plantas à salinidade: Aspectos fisiológicos
 515 e bioquímicos. *Enciclopédia Biosfera.* 2010;6(11):1-18.
- 516 [7] Achten WMJ, Maes WH, Reubens B, Mathijs E, Singh VP, Verchot L, et al.
 517 Biomass production and allocation in *Jatropha curcas* L. seedlings under different
 518 levels of drought stress. *Biomass Bioenerg.* 2010;34(5):667-76.
- 519 [8] Pompelli MF, Ferreira DTRG, Cavalcante PPGS, Salvador TL, Hsie BS, Endres L.
 520 Environmental influence on the physico-chemical and physiological properties of
 521 *Jatropha curcas* L. seeds. *Aust J Bot.* 2010;58(6):421-7.
- 522 [9] Pandey VC, Singh K, Singh JS, Kumar A, Singh B, Singh RP. *Jatropha curcas*: A
 523 potential biofuel plant for sustainable environmental development. *Renew Sust Energy*
 524 *Rev.* 2012;16(5):2870-83.
- 525 [10] Tapanes NCO, Aranda DAG, Carneiro JWM, Antunes OAC. Transesterification of
 526 *Jatropha curcas* oil glycerides: Theoretical and experimental studies of biodiesel
 527 reaction. *Fuel.* 2008;87(10-11):2286-95.
- 528 [11] Kumar A, Sharma S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial
 529 uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Ind Crops Prod.* 2008;28:1-10.
- 530 [12] Beltrão NE, Severino LS, Suinaga FA, Veloso JF, Junqueira N, Fidelis M, et al.
 531 Pinhão Manso: recomendação técnica sobre o plantio no Brasil. *Campina Grande:*
 532 *Embrapa Algodão;* 2007.
- 533 [13] Abhilash PC, Srivastava P, Jamil S, Singh N. Revisited *Jatropha curcas* as an oil
 534 plant of multiple benefits: Critical research needs and prospects for the future. *Environ*
 535 *Sci Pollut Res.* 2010;18(1):127–31.

- 536 [14] Arcoverde GB, Rodrigues BM, Pompelli MF, Santos MG. Water relations and
537 some aspects of leaf metabolism of *Jatropha curcas* young plants under two water
538 deficit levels and recovery. *Braz J Plant Physiol.* 2011;23(2):123-30.
- 539 [15] Campos MLO, Hsie BS, Granja JAA, Correia RM, Silva SRS, Almeida-Cortez JS,
540 et al. Photosynthesis and antioxidant activity mechanisms in *Jatropha curcas* L. under
541 salt stress. *Braz J Plant Physiol.* 2012;24(1):55-67.
- 542 [16] Contran N, Chessa L, Lubino M, Bellavite D, Roggero PP, Enne G. State-of-the art
543 of the *Jatropha curcas* productive chain: From sowing to biodiesel and by-products. *Ind*
544 *Crops Prod.* 2013;42(1):202-15.
- 545 [17] Díaz-López L, Gimeno V, Lidón V, Simón I, Mantínez V, García-Sánchez F. The
546 tolerance of *Jatropha curcas* seedlings to NaCl: An ecophysiological analysis. *Plant*
547 *Physiology and Biochemistry.* 2012;54:34-42.
- 548 [18] Eswaran N, Parameswaran S, Anantharaman B, Kumar GRK, Sathram B, Johnson
549 TS. Generation of an expressed sequence tag (EST) library from salt-stressed roots of
550 *Jatropha curcas* for identification of abiotic stress-responsive genes. *Plant Biol.*
551 2011;14(3):428-37.
- 552 [19] Fini A, Bellasio C, Pollastrin S, Tattini M, Ferrini F. Water relations, growth, and
553 leaf gas exchange as affected by water stress in *Jatropha curcas*. *J Arid Environ.*
554 2013;89(1):21-9.
- 555 [20] Gao S, Ouyang C, Wang S, Xu Y, Tang L, Chen F. Effects of salt stress on growth,
556 antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L.
557 seedlings. *Plant Soil Environ.* 2008;54(9):374-81.
- 558 [21] Hsie BS, Mendes KR, Antunes WC, Endres L, Campos MLO, Souza FC, et al.
559 *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) modulates stomatal traits in response to leaf-to-air
560 vapor pressure deficit. *Biomass Bioenerg.* 2015;81(1):273-81.
- 561 [22] Santos CM, Veríssimo V, Wanderley-Filho HCL, Ferreira VM, Cavalcante PGS,
562 Rolim EV, et al. Seasonal variations of photosynthesis, gas exchange, quantum
563 efficiency of photosystem II and biochemical responses of *Jatropha curcas* L. grown in
564 semi-humid and semi-arid areas subjected to water stress. *Ind Crops Prod.*
565 2013;41(1):203-13.
- 566 [23] Openshaw K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise.
567 *Biomass Bioenerg.* 2000;19(1):1-15.
- 568 [24] Silva EN, Ribeiro RV, Ferreira-Silva SL, Viégas RA, Silveira JAG. Comparative
569 effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of
570 *Jatropha curcas* plants. *Journal of Arid Environments.* 2010;74:1130-7.
- 571 [25] Azevedo Neto AD, Pereira PPA, Costa DP, Santos ACC. Fluorescência da
572 clorofila como uma ferramenta possível para seleção de tolerância à salinidade em
573 girassol. *Rev Ciência Agr.* 2011;42(4):893-7.
- 574 [26] Moncaleano-Escandon J, Silva BCF, Silva SRS, Granja JA, Alves MCJL, Pompelli
575 MF. Germination responses of *Jatropha curcas* L. seeds to storage and aging. *Ind Crops*
576 *Prod.* 2013;44(1):684-90.
- 577 [27] Epstein E. Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. New York: John
578 Wiley & Sons; 1972.
- 579 [28] Pompelli MF, Barata-Luís RM, Vitorino HS, Gonçalves ER, Rolim EV, Santos
580 MG, et al. Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under
581 drought deficit and recovery. *Biomass Bioenerg.* 2010;34(8):1207-15.
- 582 [29] Buck AL. New equations for computing vapor pressure and enhancement factor. *J*
583 *Appl Meteorol.* 1981;20(12):1527-32.

- 584 [30] Demmig-Adams B, Adams III WW, Barker DH, Logan BA, Bowling DR,
585 Verhoeven AS. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light
586 allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiol Plant*. 1996;98(2):253-64.
- 587 [31] Baker NR. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev*
588 *Plant Biol*. 2008;59(1):89-113.
- 589 [32] Nandwal AS, Kukreja S, Kumar N, Sharma PK, Jain M, Mann A, et al. Plant water
590 status, ethylene evolution, N₂-fixing efficiency, antioxidant activity and lipid
591 peroxidation in *Cicer arietinum* L. nodules as affected by short-term salinization and
592 desalinization. *J Plant Physiol*. 2007;164(9):1161-9.
- 593 [33] Prickett RC, Elliott JAW, Hakda S, McGann LE. A non-ideal replacement for the
594 Boyle van't Hoff equation. *Cryobiology*. 2008;57:130-6.
- 595 [34] Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA. Avaliação do estado nutricional das plantas:
596 princípio e aplicações. 2 ed. Piracicaba: Potafos; 1997.
- 597 [35] de Mendiburu F. *Agricolae: statistical procedures for agricultural research* [WWW
598 Document]. R CRAN. URL: R Development Core Team 2017; 2016.
- 599 [36] Flexas J, Medrano H. Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ plants: stomatal
600 and non-stomatal limitations revisited. *Ann Bot*. 2002;89(2):183-9.
- 601 [37] Abdu-Aguye I, Sannusi A, Alafiya-Tayo RA, Bhusnurmath SR. Acute toxicity
602 studies with *Jatropha curcas*. *Hum Toxicol*. 1986;5(4):269-74.
- 603 [38] Praxedes SC, Lacerda CF, DaMatta FM, Prisco JT, Gomes-Filho E. Salt tolerance
604 is associated with differences in ion accumulation, biomass allocation and
605 photosynthesis in cowpea cultivars. *J Agron Crop Sci*. 2010;196(3):193-204.
- 606 [39] Gupta B, Huang B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological,
607 biochemical, and molecular characterization. *Int J Genomics*. 2014;2014:18 pages.
- 608 [40] Gururani MA, Venkatesh J, Tran L-SP. Regulation of photosynthesis during
609 abiotic stress-induced photoinhibition. *Mol Plant*. 2015;8:1304-20.
- 610 [41] Díaz-López L, Gimeno V, Simón I, Martínez V, Rodríguez-Ortega WM, García-
611 Sánchez F. *Jatropha curcas* seedlings show a water conservation strategy under drought
612 conditions based on decreasing leaf growth and stomatal conductance. *Agr Water*
613 *Manage*. 2012;105(1):48-56.
- 614 [42] Silva EN, Silveira JAG, Rodrigues CRF, Lima CS, Viégas RA. Contribuição de
615 solutos orgânicos e inorgânicos no ajustamento osmótico de pinhão-mansô submetido à
616 salinidade. *Pesqui Agropecu Bras*. 2009;44(5):437-45.
- 617 [43] Silva EN, Silva SLF, Viégas RA, Silveira JAG. The role of organic and inorganic
618 solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. *Environ*
619 *Exp Bot*. 2010;69(3):279-85.
- 620 [44] Silveira JAG, Araújo SAM, Lima JPMS, Viégas RA. Roots and leaves display
621 contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex*
622 *nummularia*. *Environ Exp Bot*. 2009;66(1):1-8.
- 623 [45] Tavakkoli E, Fatehi F, Coventry S, Rengasamy P, McDonald GK. Additive effects
624 of Na⁺ and Cl⁻ ions on barley growth under salinity stress. *J Exp Bot*. 2011;62(6):2189-
625 203.
- 626 [46] Hussain MI, Lyra D-A, Farooq M, Nikoloudakis N, Khalid N. Salt and drought
627 stresses in safflower: a review. *Agron Sustain Dev*. 2016;36(4):1.
- 628 [47] Garcia GO, Ferreira PA, Miranda GV, Neves JCL, Moraes WB, Santos DB. Teores
629 foliares dos macronutrientes catiônicos e suas relações com o sódio em plantas de milho
630 sob estresse salino. *Idesia*. 2007;25(3):93-106.
- 631 [48] Hauser F, Horie T. A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by
632 HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺
633 ratio in leaves during salinity stress. *Plant Cell Environ*. 2010;33:552-65.

- 634 [49] Greenway H, Munns R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu Rev*
635 *Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1980;31:149-90.
- 636 [50] Roy SJ, Negrão S, Tester M. Salt resistant crop plants. *Curr Opin Biotechnol.*
637 2014;26(1):115 - 24.
- 638 [51] Melo HF, Souza ER, Duarte HHF, Cunha JC, Santos HRB. Gas exchange and
639 photosynthetic pigments in bell pepper irrigated with saline water. *Rev Bras Eng Agr*
640 *Amb.* 2017;21(1):38-43.
- 641 [52] Rosolem CA. Interação do potássio com outros íons. In: Yamada T, Roberts TL,
642 editors. Potássio na agricultura brasileira. Piracicaba: Potafos; 2005. p. 239-60.
- 643 [53] Melloni R, Silva FAM, Carvalho JG. Cálcio, magnésio e potássio como
644 amenizadores dos efeitos da salinidade sobre a nutrição mineral e o crescimento de
645 mudas de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*). *Cerne.* 2000;6(2):35-40.
- 646 [54] Malavolta E. Absorção, transporte e redistribuição. In: Malavolta E, editor. Manual
647 de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Editora Agronômica Ceres; 2006. p. 638.
- 648 [55] Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ. Plant cellular and molecular
649 responses to high salinity. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 2000;51:463-99.
- 650 [56] Bastos EA, Nascimento SP, Silva EM, Freire Filho FR, Gomide RL. Identification
651 of cowpea genotypes for drought tolerance. *Rev Ciência Agr.* 2011;42(1):100-7.
- 652 [57] Hussain S, Zhang J-H, Zhong C, Zhu L-F, Cao X-C, Yu S-M, et al. Effects of salt
653 stress on rice growth, development characteristics, and the regulating ways: A review. *J*
654 *Integrative Agr.* 2017;16(11):2357-74.
- 655 [58] Yu Y, Ni Z, Chen Q, Qu Y. The wheat salinity-induced R2R3-MYB transcription
656 factor TaSIM confers salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Bioph Res*
657 *Co.* 2017;491(3):642-8.
- 658 [59] Sales CRG, Ribeiro RV, Silveira JAG, Machado EC, Martins MO, Lagôa AMMA.
659 Superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improve the recovery of photosynthesis
660 in sugarcane plants subjected to water deficit and low substrate temperature. *Plant*
661 *Physiol Bioch.* 2013;73:326-36.
- 662 [60] Zlatev Z, Yordanov I. Effects of soil drought on photosynthesis and chlorophyll
663 fluorescence in common bean plants. *Bulg J Plant Physiol.* 2004;30(3-4):3-18.
- 664 [61] Silva PEM, Cavatte PC, Morais LE, Medina EF, DaMatta FM. The functional
665 divergence of biomass partitioning, carbon gain and water use in *Coffea canephora* in
666 response to the water supply: implications for breeding aimed at improving drought
667 tolerance. *Environ Exp Bot.* 2013;87(1):49-57.
- 668 [62] Chaves MM, Costa JM, Zarrouk O, Pinheiro C, Lopes CM, Pereira JS. Controlling
669 stomatal aperture in semi-arid regions-The dilemma of saving water or being cool?
670 *Plant Sci.* 2016;251(1):54-64.
- 671 [63] Tooulakou G, Giannopoulos A, Nikolopoulos D, Bresta P, Dotsika E, Orkoula
672 MG, et al. Alarm photosynthesis: Calcium oxalate crystals as an internal CO₂ source in
673 plants. *Plant Physiol.* 2016;171:2577 - 85.
- 674 [64] Mendes KR, Granja JAA, Ometto JP, Antonino ACD, Menezes RSC, Pereira EC,
675 et al. *Croton blanchetianus* modulates its morphophysiological responses to tolerate
676 drought in a tropical dry forest. *Funct Plant Biol.* 2017;44(10).
- 677 [65] Araújo WL, Dias PC, Moraes GABK, Celin EF, Cunha RL, Barros RS, et al.
678 Limitations to photosynthesis in coffee leaves from different canopy positions. *Plant*
679 *Physiol Biochem.* 2008;46(10):884-90.
- 680 [66] Kalaji HM, Jajoo A, Oukarroum A, Brestic M, Zivcak M, Samborska IA, et al. The
681 use of chlorophyll fluorescence kinetics analysis to study the performance of
682 photosynthetic machinery in plants. *Emerg Technol Manag Crop Stress Tolerance.*
683 2014;2(347-384).

- 684 [67] Cen Y-P, Sage RF. The regulation of rubisco activity in response to variation in
685 temperature and atmospheric CO₂ partial pressure in sweet potato. *Plant Physiol.*
686 2005;139(2):979-90.
- 687 [68] Egneus H, Heber U, Kirk M. Reduction of oxygen by the electron transport chain
688 of chloroplasts during assimilation of carbon dioxide. *Biochim Biophys Acta.*
689 1975;408:252-68.
- 690 [69] Farquhar GD, von Caemmerer S, Berry JA. A biochemical model of photosynthetic
691 CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta.* 1980;149(1):78-90.
- 692 [70] Griffiths H, Brent RH. Mesophyll conductance: internal insights of leaf carbon
693 exchange. *Plant, Cell & Environment.* 2013;36(4):733-5.
- 694 [71] Keenan T, Sabate S, Gracia C. The importance of mesophyll conductance in
695 regulating forest ecosystem productivity during drought periods. *Glob Change Biol.*
696 2010;16(3):1019-34.
- 697 [72] Flexas J, Escalona JM, Medrano H. Water stress induces different levels of
698 photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. *Plant Cell Environ.*
699 1999;22(1):39-48.
- 700 [73] Kanechi M, Uchida N, Yasuda T, Yamaguchi T. Non-stomatal inhibition
701 associated with inactivation of rubisco in dehydrated coffee leaves under unshaded and
702 shaded conditions. *Plant Cell Physiol.* 1996;37(4):455-60.
- 703 [74] Björkman O. Responses to different quantum flux densities. In: Lange OL, Nobel
704 PS, Osmond CB, Ziegler H, editors. *Encyclopaedia of Plant Physiology.* Berlin:
705 Springer; 1981. p. 57-107.
- 706 [75] Osmond B, Badger M, Maxwell K, Björkman O, Leegood R. Too many photons:
707 photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends Plant Sci.* 1997;2(4):119-
708 21.
- 709 [76] Maxwell K, Johnson GN. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot.*
710 2000;51(345):659-68.
- 711 [77] Medrano H, Escalona JM, Bota J, Gulías J, Flexas J. Regulation of photosynthesis
712 of C₃ plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference
713 parameter. *Ann Bot.* 2002;89(7):895-905.
- 714 [78] Lima JD, Mosquim PR, DaMatta FM. Leaf gas exchange and chlorophyll
715 fluorescence parameters in *Phaseolus vulgaris* as affected by nitrogen and phosphorus
716 deficiency. *Photosynthetica.* 1999;37(1):113-21.
- 717 [79] Voss I, Sunil B, Scheibe R, A.S. R. Emerging concept for the role of
718 photorespiration as an important part of abiotic stress response. *plant Biol (Stuttg).*
719 2013;15(4):713 - 22.

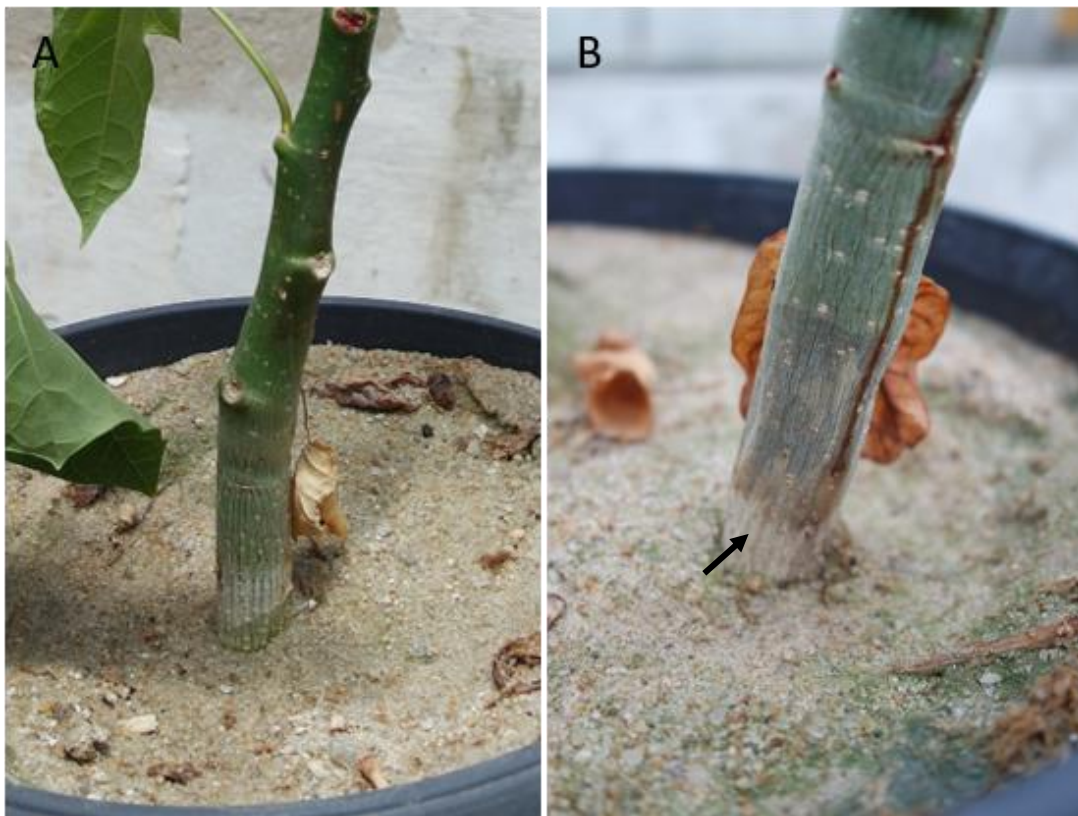
Material Suplementar

Figura S1. Aspecto dos caules de plantas jovens de *Jatropha curcas* genótipo CNPAE112 (A) e CNPAE218 (B) submetidos à 750 mM de NaCl, ao final da recuperação, evidenciando necrose na base do órgão (seta), caracterizado pelo murchamento do tecido e coloração marrom. Fonte: Elaborada pelo autor.

ARTIGO II

*ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA **JOURNAL OF PROTEOMICS****

1 **Proteômica diferencial de genótipos de *Jatropha curcas* contrastantes para tolerância à**
2 **salinidade**

3

4 Natália Corte-Real^{a,b}, Melquisedec de Sousa Oliveira^c, Laurício Endres^d, Marcelo Francisco
5 Pompelli^b, Tercilio Calsa Junior^{*c},

6

7 ^a Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural
8 de Pernambuco, Recife - PE, 52171-900, Brasil.

9 ^b Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de
10 Pernambuco, Recife – PE, 50670-901, Brasil.

11 ^c Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética, Centro de
12 Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 50730-120, Brasil.

13 ^d Laboratório de Fisiologia Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas,
14 Maceió - AL, 57072-900, Brasil.

15 * Autor para correspondência: Calsa Junior, T. Tel.: +55 81 2126 7829; email: terciliojr@yahoo.com.br

16

17 **Resumo**

18 A resposta vegetal ao estresse salino é uma rede complexa de alterações fisiológicas e
19 metabólicas em busca de um sucesso adaptativo, de acordo com sua carga genética e principalmente
20 com a ativação dos genes. Sendo assim, esse trabalho objetivou estudar o perfil proteômico diferencial
21 em genótipos de pinhão-manso contrastantes, submetidos ao estresse salino, contribuindo assim para
22 a identificação de proteínas candidatas a marcadores moleculares em resposta a salinidade. Foram
23 realizadas coletas para a análise proteômica visando identificação de proteínas diferencialmente
24 acumuladas em dois genótipos com diferentes respostas à condição salina (CNPAE183 - tolerante e
25 CNPAE218 - sensível), submetidos à 750 mM de NaCl durante 48 horas. Com as amostras vegetais
26 foram realizadas extração, purificação e quantificação de proteínas solúveis totais. Posteriormente,
27 realizou-se focalização isoeletrica das amostras dos genótipos, em fita impregnada com acrilamida

28 desidratada (IPG 13 cm, gradiente de pH 3-10). A eletroforese foi conduzida em gel desnaturante de
29 poliacrilamida 12,5%, e os géis resultantes corados, analisados e identificadas as proteínas
30 diferencialmente acumuladas (DAPs). Foram identificadas 110 DAPs em *J. curcas* responsivas à
31 salinidade, presumivelmente associadas com processos metabólicos de ADP, de ribonucleotídeos,
32 derivados de carboidratos e piruvato, bem como processos envolvidos com a biossíntese de ATP e
33 resposta aos íons metálicos como sendo os principais processos biológicos associados à maior
34 tolerância do genótipo CNPAE183. Dessa forma, os resultados revelam que as respostas biológicas à
35 condição salina estão intimamente relacionadas ao genótipo. O genótipo mais tolerante apresentou
36 proteínas de diferentes vias importantes para a resposta à salinidade, incluindo produção de proteínas
37 envolvidas na sinalização, metabolismo antioxidante, bem como enzimas importantes de outras vias
38 metabólicas de produção de energia, como fotossíntese e glicólise, sugerindo a manutenção do seu
39 crescimento e desenvolvimento.

40

41 **Palavras-chave:** Pinhão-mansão, NaCl, estresse abiótico, peptídeo, espectrometria de massa, gel 2D.

42

43 **1. Introdução**

44 As plantas estão continuamente sujeitas a inúmeras condições ambientais que podem
45 promover alterações fisiológicas e metabólicas, gerando respostas que são dependentes da carga
46 genética e, principalmente, ativação de genes [1] em busca de sucesso adaptativo em diversas
47 condições edafoclimáticas. Dentre tais fatores ambientais, a salinidade, associada ao estresse hídrico,
48 é considerada como uma das condições estressantes mais severas e limitantes para o cultivo em larga
49 escala [2].

50 A salinidade altera diversos processos biológicos vitais como a fotossíntese e síntese proteica
51 [3], bem como produção de ácidos graxos e acúmulo de solutos [4]. A resposta vegetal à salinidade é
52 um complexo processo que envolve mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares para
53 auxiliar no enfrentamento ao estresse osmótico e/ou iônico, tais como a síntese de hormônios, de

54 enzimas antioxidativas e de solutos compatíveis, bem como controle de exclusão,
55 compartimentalização e inclusão de íons pela raiz e seu transporte para parte aérea [2, 5]. Todas essas
56 respostas frente condições adversas, decorrem da regulação da expressão de genes específicos, que
57 podem alterar a tradução de proteínas, bem como processos de modificação pós-traducional,
58 acarretando alterações nos mecanismos de regulação e sinalização celular [3, 6].

59 Os genes induzidos pela salinidade são muitas vezes também induzidos por seca, mostrando
60 uma íntima relação entre essas duas condições. Nesse sentido, pelo menos quatro vias de sinalização
61 independentes atuam na indução de genes sob condições de seca: duas dependentes de ABA e outras
62 duas independentes de ABA [7]. Uma das vias dependentes requer ação de fatores de transcrição do
63 tipo *myeloblast* (MYB) e *myelocytomatosis* (MYC) [8]. Além dos mecanismos de regulação em nível
64 transcricional e pós-transcricional, foi demonstrado que algumas proteínas quinase ativadas por
65 mitógenos (MAPK) atuam em nível pós-traducional em decorrência de diversos tipos de estresse,
66 incluindo seca e frio [9].

67 Em resposta à salinidade, diversas proteínas têm sido identificadas estando associadas à
68 membrana plasmática, tipicamente receptores e quinases cuja regulação é responsiva a outros fatores
69 de estresse tais como frio, seca e tratamento com ABA [10]. Além disso, várias enzimas do
70 metabolismo oxidativo (superóxido dismutase - SOD, ascorbato peroxidase - APX, catalase - CAT)
71 mostraram-se altamente responsivas a estresses abióticos isolados ou em associação [11, 12]. Apesar
72 da relevância das respostas fisiológicas associadas ao proteoma frente à salinidade, poucas
73 informações estão disponíveis sobre variações no acúmulo de proteínas foliares em pinhão-manso
74 (*Jatropha curcas* L.) sob tais condições.

75 *J. curcas* é uma espécie da família Euphorbiaceae que tem se destacado pelo seu uso potencial
76 na indústria de biodiesel [13], devido ao alto teor de óleo encontrado nas sementes, com média de
77 34% [14], e produtividade que pode chegar a 2,37 t ha⁻¹ ano⁻¹ [15], além de apresentar adaptação a
78 diversas condições edafoclimáticas [16]. Em se tratando de estudos proteômicos para a espécie, nos
79 últimos anos, diversas pesquisas tem sido direcionadas ao pinhão-manso, principalmente em relação

80 às sementes e ao desenvolvimento do endosperma [17], tegumento [18, 19], embrião [20, 21],
 81 plastídeo de sementes em desenvolvimento [22], bem como a produção e translocação do óleo [23-
 82 26]. Esse tipo de abordagem é particularmente relevante visando-se o melhoramento genético para a
 83 indústria de biodiesel. Contudo, são escassos estudos do proteoma foliar, apesar de tratar-se do órgão
 84 de biossíntese primária de ácidos graxos, precursores dos lipídeos de reserva das sementes. Ainda,
 85 poucos trabalhos empregam a identificação de proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) na
 86 compreensão das respostas frente a estresses abióticos em pinhão-mansão.

87 Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar o proteoma foliar diferencial em genótipos de
 88 pinhão-mansão contrastantes submetidos a salinidade, utilizando eletroforese bidimensional. Os
 89 resultados obtidos poderão contribuir na compreensão das respostas moleculares de enfrentamento a
 90 salinidade em *J. curcas*, bem como na identificação de potenciais biomarcadores funcionais para o
 91 melhoramento assistido.

92

93 **2. Material e Métodos**

94 *2.1 Material vegetal e condições de crescimento*

95 Os genótipos utilizados nesse trabalho (Tabela 1) são provenientes de diferentes regiões do
 96 Brasil e fazem parte do banco ativo de germoplasma (BAG) da Embrapa Agroenergia (Brasília – DF).

97

98 Tabela 1. Localização de origem dos seis genótipos de *Jatropha curcas* selecionados.

Genótipo	Cidade – Estado	Localização geográfica
CNPAE112	Petrolina – PE	09°04'04''S, 40°19'06,36''W/382 m a.s.l.
CNPAE114	Umuarama – PR	23°47'55''S, 53°18'48''W / 430 m a.s.l.
JCAL171	Rio Largo – AL	09°28'42''S, 35°51'21''W / 134 m a.s.l.
CNPAE183	Jaíba – MG	15°10'03''S, 43°53'18,4''W / 478 m a.s.l.
CNPAE218	São Miguel do Araguaia – GO	13°55'57''S, 50°09'17''W / 350 m a.s.l.
CNPAE304	Campina Grande – PB	07°13'33,41''S, 35°54'88''W/539 m a.s.l.

99

100 Plantas oriundas de germinação de sementes foram mantidas em vasos plásticos (9 L) com
 101 areia lavada, em casa de vegetação, localizada na Universidade Federal de Pernambuco (8°02' S,

102 39°56' W, 15 m a.s.l), sendo fertirrigadas em dias alternados com solução nutritiva de Hoagland a 50
103 % (pH 5,8) [27] durante 15 dias. Posteriormente, a fertirrigação foi substituída por solução de
104 Hoagland 100 % até as plantas completarem três meses (Corte-Real et al, manuscrito em preparação
105 - Capítulo I).

106

107 *2.2 Tratamento salino*

108 As plantas foram irrigadas diariamente, de acordo com o tratamento, sempre nas primeiras
109 horas da manhã (6:00 - 7:00 h) por três dias. Os tratamentos salinos foram compostos de diferentes
110 concentrações de sal acrescida à solução nutritiva de Hoagland constituindo assim quatro tratamentos
111 salino: 0 mM, 250 mM, 500 mM e 750 mM de NaCl correspondendo respectivamente a 1,4; 23,1;
112 36,3 e 46,8 dS m⁻¹ de condutividade elétrica. Posteriormente, a condição salina foi retirada do
113 substrato através de lavagens contínuas com água deionizada. Em sequência, as plantas voltaram a
114 receber solução nutritiva de Hoagland até atingirem completa recuperação, aos 35 dias após o início
115 do tratamento salino (conforme Corte-Real et al, manuscrito em preparação - Capítulo I).

116 A coleta do material vegetal ocorreu ao terceiro dia (48 h) e ao final da recuperação (914 h).
117 Assim, uma folha de cada indivíduo, completamente expandida e sem sinais de ataques de patógeno
118 ou lesões mecânicas, foi coletada, lavada e armazenada em ultra freezer (-80 °C) até realização das
119 análises. Para os parâmetros fisiológicos e nutricionais o delineamento experimental foi em blocos ao
120 acaso, em esquema fatorial 6 x 4 (seis genótipos e quatro concentrações de NaCl), em quatro
121 repetições. Com base em resultados prévios (Corte-Real et al, manuscrito em preparação - Capítulo
122 I), foram selecionados para a análise proteômica os genótipos mais (CNPAE183) e menos
123 (CNPAE218) tolerantes à salinidade. Foram coletadas folhas do terço médio de cada genótipo, ambos
124 sob condição salina (750 mM de NaCl).

125

126 *2.3 Extração de proteínas e quantificação*

127 Amostras de 200 mg das folhas foram trituradas com nitrogênio líquido, e material proteico
128 solúvel foi extraído com solução tampão Tris-HCl 0,5 M/sacarose 7 M e fenol saturado. As proteínas
129 da fase fenólica foram precipitadas adicionando-se cinco volumes de acetato de amônia 0,1 M em
130 metanol e incubadas a -20°C por 16 h. Em seguida, o extrato proteico foi centrifugado por 30 min a
131 10.000 g a 4°C, e o sedimento lavado duas vezes com 0,1 M de acetato de amônio em metanol gelado
132 e uma vez em acetona gelada. A cada etapa o extrato foi incubado por 30 min a -20°C e centrifugado
133 por 30 min a 10.000 g a 4°C. Após secagem, o sedimento foi ressuspenso em tampão de solubilização
134 [Tris-HCl 50 mM (pH 8,8), uréia 7 M, tiuréia 2 M, Triton 0,4% (v/v), CHAPS 2% (m/v), DTT 70
135 mM, anfolinas 0,8% (v/v)] [28]. As proteínas foram analisadas quanto à integridade por eletroforese
136 em gel de poliacrilamida 12,5% desnaturante (SDS-PAGE), quantificadas conforme método Bradford
137 [29].

138

139 *2.4. Análise de proteínas por eletroforese bidimensional*

140 Alíquotas de 500 µg de proteínas de cada extrato foram adicionadas de azul de bromofenol
141 0,005% (m/v) e submetidas à focalização isoeletrica (IPG buffer, pH 3-10 não-linear; GE Life
142 Sciences). Os extratos foram aplicados sob fitas impregnadas com acrilamida desidratada (IPG 13
143 cm, gradiente de pH 3-10 não-linear; GE Life Science), as quais foram reidratadas no sistema
144 Multiphor II (GE Life Sciences) durante 7 h a 20°C. Em seguida, as fitas IPG foram equilibradas por
145 20 min em duas soluções redutoras de pontes de dissulfeto (como detalhado por Pacheco et al. [30]).
146 A segunda dimensão foi conduzida em SDS-PAGE vertical 12,5% a 10°C. Os géis resultantes foram
147 impregnados com corante coloidal azul de Coomassie G 250, conforme metodologia descrita por
148 Candiano et al.[31].

149

150 *2.5 Aquisição e análise das imagens*

151 Os géis 2D de *J. curcas* foram digitalizados no sistema ImageScanner III e as respectivas
152 imagens processadas no programa LabScan 6.0 (GE Life Sciences). O acúmulo diferencial de

153 proteínas foi determinado a partir das imagens dos géis utilizando o programa ImageMaster 2D
154 Platinum v.7.05 (GE Life Sciences). Proteínas (~*spots*) com acúmulo estatisticamente significativo (p
155 $\leq 0,05$) e razão de variação na % vol $\geq 1,5$ foram selecionadas e consideradas como diferencialmente
156 acumuladas (DAPs), e submetidas à identificação por espectrometria de massas.

157

158 2.6 Digestão com tripsina e espectrometria de massas

159 As proteínas (*spots*) selecionadas foram excisadas dos géis e descoradas com bicarbonato de
160 amônio 25 mM e acetonitrila 50 % (v/v) por duas vezes a 30 min. Os fragmentos de gel foram
161 desidratados com acetonitrila 100 % por 5 min, a solução excedente descartada e os fragmentos de
162 gel foram secos por evaporação e reidratados em solução contendo DTT 20 mM em bicarbonato de
163 amônio 50 mM e incubados por 40 min a 60°C. A preparação dos peptídeos diferenciais selecionados
164 foi realizada conforme metodologia descrita por Souza [32]. As soluções contendo os peptídeos
165 extraídos foram secas a 30°C em concentrador a vácuo, seguindo-se sua ressuspensão em ácido
166 fórmico 1 % (v/v) e transferência para tubos novos. Para a análise em espectrômetro de massas
167 MALDI-ToF/ToF AutoFlex III (Bruker Daltonics, Inc.), na Central Analítica do Centro de
168 Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), o pellet foi solubilizado em 5 μ l de TFA 0,1%.
169 Para cada ciclo de leitura, foram misturados 2 μ l da amostra com 2 μ l de matriz de ácido α -ciano-4-
170 hidroxicinâmico em ACN e TFA 3%, sendo aplicados 2 μ l em duplicata nas células da placa metálica.

171

172 2.7 Identificação presumível e Análise bioinformática

173 A identificação presumível dos espectros de massa (MS) obtidos na análise dos peptídeos foi
174 realizada com uso do programa MASCOT (Matrix Inc.;
175 (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html), pela versão de acesso público do
176 software, pelo método PMF (peptide mass fingerprinting, ou tipagem por massa do peptídeo)
177 utilizando os sub-bancos de dados Viridiplantae e Arabidopsis (Swissport e NCBIProt), adotando-se
178 os seguintes parâmetros: i) modificação fixa: carbamidometilação (C); ii) modificação variável:

179 oxidação (M); e iii) tolerância: 100 ppm a 1.2 Da. Posteriormente, foi conduzida identificação
180 complementar através de versão privada do programa MASCOT, gentilmente disponibilizada para
181 acesso em colaboração com o Centro de Proteômica Avançada da Universidade de Washington
182 (Seattle, Washington, EUA; <http://proteomicsresource.washington.edu/>), pelo método PMF
183 utilizando os sub-bancos de dados Euphorbiaceae e *Jatropha curcas*, adotando-se os seguintes
184 parâmetros: i) modificação fixa: carbamidometilação (C); ii) modificação variável: oxidação (M); e
185 iii) tolerância: 200 ppm a 1.2 Da. Foram consideradas significativas as identificações com *score*
186 maior ou igual ao valor limite (*cut-off*). O *score* equivale a $-10 \cdot \log(P)$, sendo P a probabilidade de a
187 similaridade encontrada ser ao acaso. Valores de *score* acima do valor limite têm significância
188 estatística ($p < 0,05$).

189 Para a análise de ontologia gênica (GO) foi utilizada a ferramenta online Mercator
190 (<http://www.plabipb.de/portal/mercator-sequence->), a partir dos arquivos FASTA/Uniprot das
191 proteínas identificadas. Foi realizado mapeamento GO relacionado aos processos biológicos, tendo
192 *Arabidopsis thaliana* como referência. A análise de enriquecimento de termos GO foi realizada na
193 plataforma online Panther (<http://www.pantherdb.org/>) referente ao genoma de *A. thaliana* e FDR
194 (*false discovery rate*) significativo, $p < 0,05$.

195

196

197 3 Resultados

198 Plantas submetidas a 750 mM de NaCl por 48 h, não apresentaram características visuais que
 199 as diferenciasssem de plantas controle, entretanto as análises fisiológicas demonstraram contraste
 200 fenotípico na resposta a salinidade, permitindo a seleção dos genótipos mais e menos tolerantes. Após
 201 a produção dos géis 2D, foi possível evidenciar que a etapa de focalização isoeétrica propiciou
 202 resolução adequada, com relativa diversidade de proteínas em diferentes faixas de pI, principalmente
 203 entre pH 4 e 7 (Figura 1). Após eletroforese, foram obtidos géis com reprodutibilidade amostral entre
 204 réplicas do mesmo genótipo também adequada: coeficiente de correlação (R) de 0,9759 no genótipo
 205 tolerante; e 0,9543 no genótipo sensível. Estes valores de R permitiram a comparação entre genótipos
 206 sob salinidade e a identificação de DAPs.

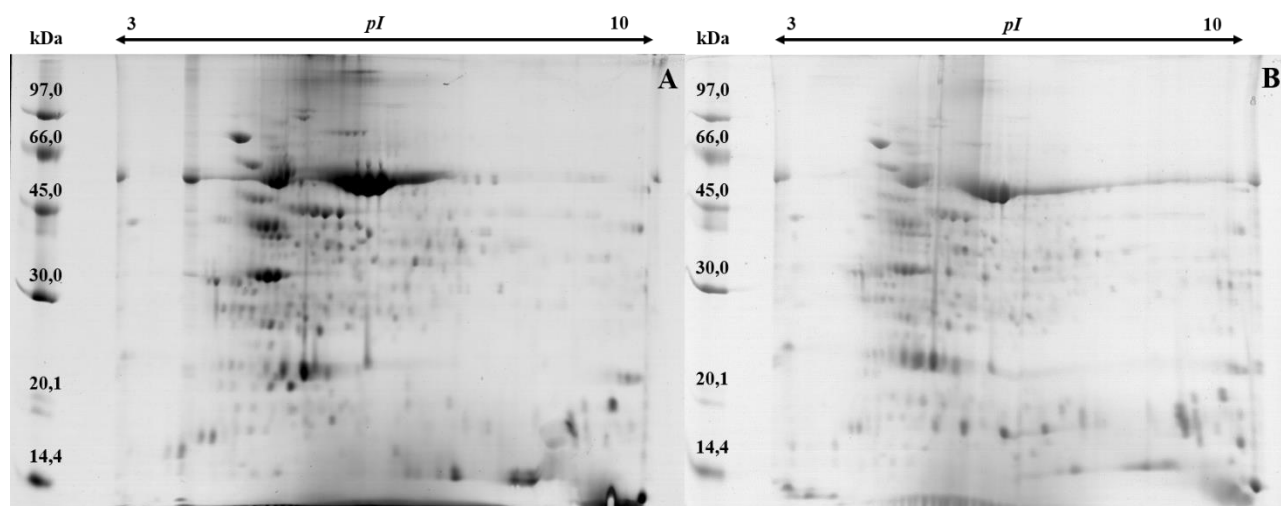


Figura 1. Gel 2D-PAGE do perfil proteômico foliar de *Jatropha curcas*, genótipo CNPAE183 (A) e genótipo CNPAE218 (B) submetidos ao estresse salino com 750 mM de NaCl.

207 A Figura 1 mostra os mapas proteômicos representativos de *J. curcas*, nos quais através da
 208 análise comparativa entre os genótipos submetidos a 750 mM de NaCl no máximo estresse. Após
 209 análise dos géis, foram detectadas 145 DAPs, cujos espectros de massa por PMF permitiram a
 210 identificação de 110 DAPs (75,86 %). Destas, 69 (62,73 %) proteínas eram exclusivas e/ou mais
 211 acumuladas no genótipo tolerante (CNPAE183; Tabela 2) e 41 (37,27 %) eram exclusivas e/ou mais
 212 acumuladas no genótipo sensível (CNPAE218; Tabela 3).

213

214 Tabela 2. Identificação de proteínas de *Jatropha curcas*, genótipos CNPAE183 submetidos a 750 mM de NaCl, usando o genótipo CNPAE218 como referência. Anotação presumível a partir
 215 dos espectros PMF/MALDI-ToF.

Spot	ANOVA	Proteínas	ID	Score	M _{Cal}	M _{Ano}	pI _{Cal}	pI _{Ano}	Espécie ortóloga	Ratío
Fotossíntese										
6	0,0463	Subunidade menor da Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase	D6BR54	88	14689	20473	7,39	9,06	<i>Jatropha curcas</i>	1,548
60	0,0078	Proteína de evolução do oxigênio isoforma 1 cloroplastidial	A0A067KA30	91	32980	35314	4,94	5,87	<i>Jatropha curcas</i>	1,313
84	0,0264	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase ativase isoforma X1 cloroplastidial	A0A067L8Y9	84	41785	52211	4,83	5,56	<i>Jatropha curcas</i>	2,422
86	0,0333	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase ativase isoforma X1 cloroplastidial	A0A067L8Y9	112	41534	52211	4,93	5,56	<i>Jatropha curcas</i>	2,834
100	0,0476	Subunidade maior da Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase	B1NWF7	183	51464	53087	6,23	6,09	<i>Jatropha curcas</i>	1,148
112	0,0072	ATP sintase subunidade beta, cloroplastidial	C0LE81	119	55182	53278	4,98	5,10	<i>Jatropha curcas</i>	1,392
115	0,0007	ATP sintase subunidade alfa	C0LE59	106	55407	55484	5,17	5,28	<i>Jatropha curcas</i>	1,704
118	0,0324	ATP sintase subunidade beta	C0LE81	118	54007	53278	5,07	5,10	<i>Jatropha curcas</i>	1,761
143	0,0312	Subunidade maior da Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase	C0LE82	204	56097	53087	5,65	6,09	<i>Jatropha curcas</i>	1,600
144	0,0342	Subunidade maior da Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase	C0LE82	64	54923	53087	5,75	6,09	<i>Jatropha curcas</i>	1,693
146	0,0462	Fator de estabilidade/montagem do PSII (HCF136), cloroplastidial	A0A067L4D0	58	38351	43076	5,14	7,08	<i>Jatropha curcas</i>	2,918
209	0,0139	ATP sintase subunidade alfa cloroplastidial	C0LE59	97	65046	55484	5,20	5,28	<i>Jatropha curcas</i>	*
216	0,0013	Subunidade menor da Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase	D6BR54	98	14535	20473	8,14	9,06	<i>Jatropha curcas</i>	*
227	0,0002	Subunidade maior da Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase	A0A199U950	70	29612	37029	5,09	8,50	<i>Manihot esculenta</i>	*
278	0,0025	Oxidase (S)-2-hidroxi-ácido peroxissômica	A0A067L0G9	82	41789	40566	9,68	9,31	<i>Jatropha curcas</i>	*
279	0,0127	Oxidase (S)-2-hidroxi-ácido peroxissômica	A0A067L0G9	81	36257	40566	9,16	9,31	<i>Jatropha curcas</i>	*
291	0,0000	Subunidade menor da Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase	D6BR54	89	14833	20473	7,17	9,06	<i>Jatropha curcas</i>	*
Glicólise										
92	0,0067	Fosfoglicerato quinase	A0A067JME5	71	43274	50648	5,86	8,41	<i>Jatropha curcas</i>	1,355
123	0,0105	Fosfoglicerato quinase	A0A067JME5	68	43411	50648	5,51	8,41	<i>Jatropha curcas</i>	1,512
282	0,0106	Piruvato quinase	B9S7Y4	67	27201	64159	6,97	6,09	<i>Ricinus communis</i>	*
Transporte de elétron mitocondrial/ síntese ATP										
111	0,0400	ATP sintase subunidade beta	A0A067KFH8	72	53924	60287	5,35	6,13	<i>Jatropha curcas</i>	2,747
131	0,0325	ATP sintase	C1MNM6	81	23614	60369	6,23	6,99	<i>Micromonas pusilla CCMP1545</i>	1,365
211	0,0020	ATP sintase subunidade beta	A0A067KFH8	83	54719	60287	5,29	6,13	<i>Jatropha curcas</i>	*
Metabolismo de aminoácido										
284	0,0021	Arginino-succinato sintase cloroplastidial	Q2QVC1	65	22137	38967	4,56	5,90	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	*
Metabolismo secundário										
42	0,0095	1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase	Q38854	55	29068	77468	4,76	7,04	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,488
Estresse										
80	0,0084	Proteína 257 similar à defensina	Q2V3S8	56	40253	9329	7,38	5,21	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,349
94	0,0002	Proteína 257 similarà defensina	Q2V3S8	56	43963	9329	5,37	5,21	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,398
145	0,0140	Proteína N isoforma X2 de resistência ao TMV	A0A067JI31	59	48572	78345	4,77	7,05	<i>Jatropha curcas</i>	1,900
236	0,0000	Ubiquitina transferase (RING E3)	B9SBC6	61	80171	116067	6,19	5,68	<i>Ricinus communis</i>	*
Redox										
231	0,0001	Catalase	A0A067L5U2	78	55418	57081	7,49	7,10	<i>Jatropha curcas</i>	*
Metabolismo C1										
214	0,0001	Proteína bifuncional (FolD2)	A0A067K8J8	64	50486	32092	6,69	7,05	<i>Jatropha curcas</i>	*
RNA										

107	0,0044	Maturase K	Q9AVL5	56	54006	59670	7,65	9,61	<i>Panax ginseng</i>	1,710
217	0,0072	Remorina	A0A067K8I1	59	16811	24708	3,96	9,78	<i>Jatropha curcas</i>	*
219	0,0000	DNA (citosina-5) metiltransferase 1A	Q7Y1I7	52	21975	172800	5,03	5,75	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	*
225	0,0001	Proteína de ligação ao TATA-box	B9SWR1	63	28096	21950	6,60	9,94	<i>Ricinus communis</i>	*
234	0,0001	RNA polimerase dirigida por DNA subunidade beta	A0A327	56	80466	120937	5,80	8,74	<i>Coffea arabica</i>	*
241	0,0000	Fator de transcrição da família MYB (PHL5)	A0A067J9G2	58	28834	29597	6,03	9,18	<i>Jatropha curcas</i>	*
242	0,0223	Fator de transcrição GATA 19	B8AR30	52	29544	29479	9,64	6,14	<i>Oryza sativa Indica Group</i>	*
265	0,0003	Fator de transcrição AS1	O80931	56	65895	42559	6,50	9,16	<i>Arabidopsis thaliana</i>	*
272	0,0010	Fator de transcrição GATA 19	B8AR30	50	32761	29479	4,54	6,14	<i>Oryza sativa Indica Group</i>	*
281	0,0010	Proteína de ligação a ácidos nucleicos	B9RAN9	61	22844	56500	5,08	5,33	<i>Ricinus communis</i>	*
289	0,0020	Fator de transcrição GATA 19	B8AR30	49	29485	29479	5,93	6,14	<i>Oryza sativa Indica Group</i>	*
DNA										
247	0,0004	Proteína FAR1 isoforma X1	A0A067LFM0	61	36634	99952	9,36	6,22	<i>Jatropha curcas</i>	*
Proteína										
58	0,0002	Proteína ribossômica L16 50S cloroplastidial	A6BM45	55	33466	15349	4,72	11,47	<i>Gnetum parvifolium</i>	1,565
88	0,0037	Proteína ribossômica L24 54S mitocondrial	A0A067L255	62	43113	24550	4,34	9,74	<i>Jatropha curcas</i>	1,865
146	0,0462	Fator de estabilidade/montagem do PSII (HCF136) cloroplastidial	A0A067L4D0	58	38351	43076	5,14	7,08	<i>Jatropha curcas</i>	2,918
223	0,0052	Proteína com domínio RING-HC RNF170	A0A067KTH4	60	28509	28318	5,22	8,80	<i>Jatropha curcas</i>	*
236	0,0000	Ubiquitina transferase (RING E3)	B9SBC6	61	80171	116067	6,19	5,68	<i>Ricinus communis</i>	*
Sinalização										
139	0,0488	Proteína At3g08570 com domínio BTB/POZ	Q9C9Z7	60	60619	70320	4,75	5,67	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,389
140	0,0098	Proteína quinase serina-treonina vegetal	B9S095	61	60752	75826	4,80	9,01	<i>Ricinus communis</i>	2,233
224	0,0001	Proteína quinase serina-treonina vegetal	B9S095	61	28542	75826	5,37	9,01	<i>Ricinus communis</i>	*
245	0,0001	Proteína ligante ao cálcio (CML45)	A0A067K9U4	60	35574	23016	6,56	4,71	<i>Jatropha curcas</i>	*
246	0,0033	Receptor quinase 4 associado à parede celular	Q9S9M2	55	35692	86269	5,82	5,66	<i>Arabidopsis thaliana</i>	*
271	0,0015	Receptor quinase 4 associado à parede celular	Q9S9M2	58	31039	86269	7,54	5,66	<i>Arabidopsis thaliana</i>	*
Célula										
222	0,0025	Quinase ciclina-dependente C-2	A0A067KX42	59	27069	57085	5,37	9,35	<i>Jatropha curcas</i>	*
Desenvolvimento										
232	0,0007	Proteína Argonauta 1	O04379	57	80069	117201	5,89	9,38	<i>Arabidopsis thaliana</i>	*
286	0,0003	Proteína similar à BPS1 (DUF793)	Q9LMM6	46	20482	38787	4,62	8,98	<i>Arabidopsis thaliana</i>	*
Transporte										
238	0,0002	Subunidade TIM50 da translocase de membrana interna mitocondrial	A0A067KLS5	58	15579	41995	4,69	7,72	<i>Jatropha curcas</i>	*
Não atribuído										
43	0,0219	Proteína hipotética	Q6K6N4	76	29120	18622	4,40	11,65	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	2,107
49	0,0204	tRNA sulfotransferase	R9VQN8	74	31060	55070	4,78	6,24	<i>Enterobacter sp.</i>	1,606
62	0,0021	Golgina de interação com RAB6 (DUF662)	F4IMV8	73	35157	9951	6,84	9,30	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,910
89	0,0186	Proteína similar à LolA	R9VWM1	59	41545	30415	5,04	9,00	<i>Enterobacter sp.</i>	1,764
95	0,0217	Proteína contendo domínios DUF4408 e DUF761	B9RK72	63	44698	27280	5,44	6,88	<i>Ricinus communis</i>	1,757
130	0,0134	Epsina 3	A0A067L925	64	92082	29185	5,34	6,17	<i>Jatropha curcas</i>	4,036
220	0,0000	Proteína At2g42460 com domínios MATH e coiled-coil	F4IN32	54	21967	34353	5,28	9,29	<i>Arabidopsis thaliana</i>	*
240	0,0000	Citocromo C peroxidase	R9VWN0	63	27336	40002	5,15	8,59	<i>Enterobacter sp., R4-368</i>	*
243	0,0002	Proteína Rhs de secreção tipo IV	R9VJV2	58	32021	165495	5,30	5,87	<i>Enterobacter sp., R4-368</i>	*
250	0,0017	Proteína de ligação a stem-loop 41 kDa b cloroplastidial	A0A067JHM3	90	40614	42666	7,72	8,84	<i>Jatropha curcas</i>	*

254	0,0005	Proteína com domínio recombinase (fragmento)	B9TDB5	62	42016	33549	5,17	9,86	<i>Ricinus communis</i>	*
275	0,0000	Citocromo C peroxidase	R9VWN0	62	99310	40002	5,54	8,59	<i>Enterobacter sp, R4-368</i>	*
295	0,0038	Proteína MARD1	B6SU95	81	14833	28633	6,77	9,48	<i>Zea mays</i>	*
Não identificado										
93	0,0469	No match	-	-	44220	-	6,23	-	<i>Jatropha curcas</i>	2,592
106	0,0116	No match	-	-	54106	-	7,86	-	<i>Jatropha curcas</i>	1,810
210	0,0001	No match	-	-	38673	-	5,02	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
215	0,0002	No match	-	-	14983	-	4,84	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
218	0,0001	No match	-	-	20598	-	6,77	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
221	0,0048	No match	-	-	23440	-	6,13	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
226	0,0277	No match	-	-	33020	-	3,06	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
228	0,0005	No match	-	-	29536	-	5,26	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
229	0,0005	No match	-	-	38975	-	6,72	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
230	0,0008	No match	-	-	41782	-	5,69	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
233	0,0000	No match	-	-	79752	-	5,99	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
235	0,0002	No match	-	-	79847	-	6,08	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
244	0,0019	No match	-	-	35155	-	7,22	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
252	0,0024	No match	-	-	41151	-	6,45	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
257	0,0413	No match	-	-	45301	-	6,98	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
258	0,0133	No match	-	-	44682	-	6,11	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
261	0,0002	No match	-	-	50819	-	6,98	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
264	0,0004	No match	-	-	65776	-	6,60	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
276	0,0094	No match	-	-	100000	-	5,40	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
277	0,0098	No match	-	-	99894	-	5,48	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
280	0,0001	No match	-	-	31041	-	7,96	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
283	0,0002	No match	-	-	22093	-	4,41	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
285	0,0000	No match	-	-	22026	-	4,82	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
288	0,0057	No match	-	-	34277	-	7,23	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
290	0,0024	No match	-	-	31774	-	6,58	-	<i>Jatropha curcas</i>	*

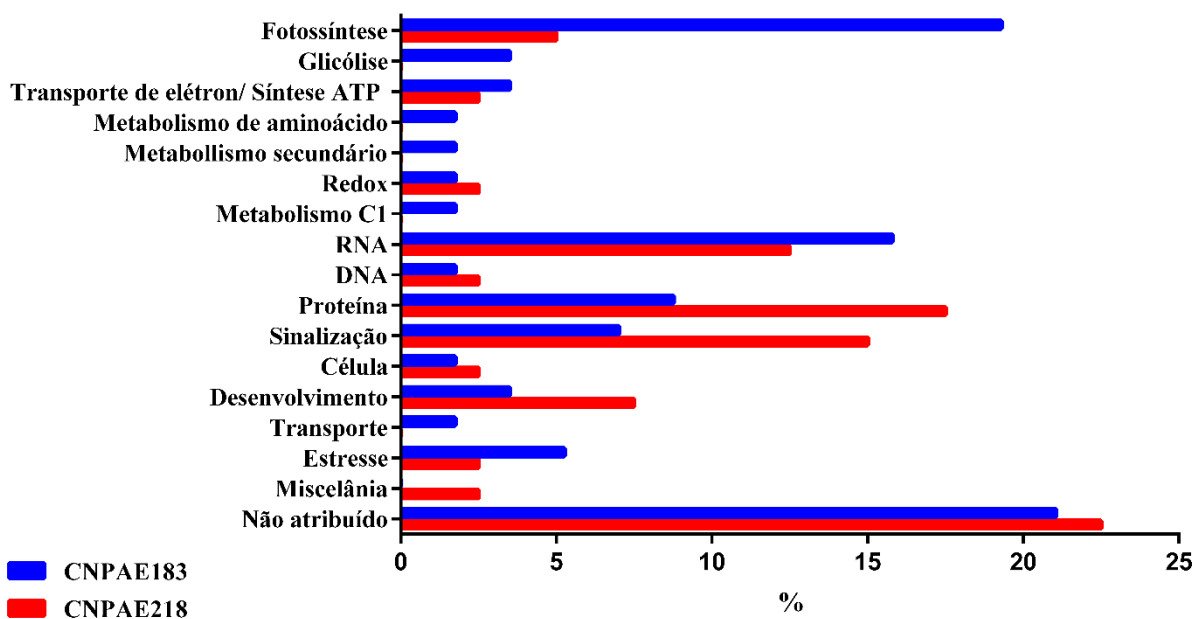
217 Tabela 3. Identificação de proteínas de *Jatropha curcas*, genótipos CNPAE218 submetidos a 750 mM de NaCl na condição de máximo estresse, usando o genótipo CNPAE183 como referência.
 218 Anotação putativa a partir de MALDI-ToF e analisada via PMF na plataforma Mascot.

Spot	ANOVA	Proteínas	ID	Score	M _{cal}	M _{ano}	pI _{cal}	pI _{ano}	Espécie ortóloga	Ratio
Fotossíntese										
119	0,0217	Subunidade menor da Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase	D6BR54	101	14667	20473	8,69	9,02	<i>Jatropha curcas</i>	3,096
179	0,0015	Subunidade maior da Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase	COLE82	140	56131	53087	3,16	6,09	<i>Jatropha curcas</i>	*
172	0,0016	Anidrase carbônica cloroplastidial	A0A067LLS5	85	28177	37150	6,76	8,07	<i>Jatropha curcas</i>	*
Transporte de elétron mitocondrial/ síntese ATP										
170	0,0058	ATP sintase	C1MNM6	81	18854	60369	8,90	6,99	<i>Micromonas pusilla CCMP1545</i>	*
Hormônios										
204	0,0002	Citocromo P450 monoxigenase	Q0JL28	69	31142	17157	9,47	9,62	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	*
Estresse										
29	0,0022	Receptor similar a quinase serina/treonina SD1-8 isoforma X1	A0A199U9G4	58	23530	36962	4,94	8,76	<i>Manihot esculenta</i>	3,892
Redox										
198	0,0003	Glutarredoxina C13	Q0IRB0	54	33848	11580	4,26	8,57	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	*
Miscelânea										
204	0,0002	Citocromo P450 monoxigenase	Q0JL28	69	31142	17157	9,47	9,62	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	*
RNA										
40	0,0449	Maturase K	Q8HQQ6	56	29130	61576	4,51	9,4	<i>Pinus pinaster</i>	1,598
77	0,0079	Fator de transcrição GATA 19	B8AR30	53	39860	29479	4,88	6,14	<i>Oryza sativa Indica Group</i>	1,544
162	0,0000	Proteína hipotética com domínio MANES_S021100 RPOL-N	A0A199UC42	59	33550	29201	4,57	9,64	<i>Manihot esculenta</i>	*
196	0,0012	Proteína contendo domínio B3 (REM8)	Q8H2D1	58	27481	52448	6,57	6,25	<i>Arabidopsis thaliana</i>	*
197	0,0074	Remorina contendo domínio C	Q0JA18	71	28098	31637	6,49	8,14	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	*
DNA										
28	0,0011	DNA polimerase	A0A067JPG7	62	23283	124988	5,15	8,35	<i>Jatropha curcas</i>	2,593
Proteína										
29	0,0022	Receptor semelhante à proteína serina/treonina quinase - SD1-8 isoforma X1	A0A199U9G4	58	23530	36962	4,94	8,76	<i>Manihot esculenta</i>	3,892
161	0,0009	Proteína fosfatase 2C 67	Q0J2R1	51	34610	39822	6,10	6,37	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	*
164	0,0123	Proteína com domínio UBX (10)	A0A067K7Q0	66	19798	41957	5,51	8,58	<i>Jatropha curcas</i>	*
165	0,0034	Proteína ribossômica L16 50S cloroplastidial	P08528	56	32946	15635	5,28	11,56	<i>Zea mays</i>	*
167	0,0030	tRNA (citidina/guanosina-2'-O)-metiltransferase	A0A067JWU0	71	18557	35215	4,90	6,02	<i>Jatropha curcas</i>	*
168	0,0021	Receptor quinase 2 de ligação a calmodulina citoplasmática	Q8VZJ9	57	16324	46374	6,82	9,26	<i>Arabidopsis thaliana</i>	*
171	0,0000	Proteína com domínio RING-HC_RNF170	A0A067KTH4	58	24690	28318	3,22	8,80	<i>Jatropha curcas</i>	*
Sinalização										
16	0,0118	Quinase cálcio-dependente 20	Q84SL0	50	18315	62768	5,44	7,00	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	2,187
29	0,0022	Receptor quainse serine/treonina SD1-8 isoforma X1	A0A199U9G4	58	23530	36962	4,94	8,76	<i>Manihot esculenta</i>	3,892
36	0,0003	Receptor quinase 4 associado à parede celular	Q9S9M2	56	27808	86269	5,42	5,66	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,547
166	0,0004	Proteína de ligação ao cálcio CML45	A0A067K9U4	60	20108	23016	5,00	4,71	<i>Jatropha curcas</i>	*
176	0,0007	Proteína com domínio BTB/POZ (At3g08570)	Q9C9Z7	60	55579	70320	7,88	5,67	<i>Arabidopsis thaliana</i>	*
180	0,0005	Proteína de ligação ao cálcio CML45	A0A067K9U4	62	62111	23016	4,56	4,71	<i>Jatropha curcas</i>	*
184	0,0032	Receptor quinase 4 associado à parede celular	Q9S9M2	56	77105	86269	6,08	5,66	<i>Arabidopsis thaliana</i>	*
Célula										
206	0,0041	Proteína da superfamília DUF1731	A0A067JUJ5	60	49514	25290	4,59	8,44	<i>Jatropha curcas</i>	*

Desenvolvimento

17	0,0001	Proteína SHI relacionada à sequência 3	Q9SJT8	55	18362	20314	5,82	9,39	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,233
27	0,0085	Metiltransferase dependente de S-adenosilmetionina (fragmento)	E5D1F9	67	23449	24924	5,55	5,35	<i>Jatropha curcas</i>	1,603
158	0,0011	Proteína da família CCT	Q8LDM8	66	18110	23363	6,98	4,95	<i>Arabidopsis thaliana</i>	*
160	0,0032	Proteína da família CCT	Q8LDM8	66	37029	23363	8,12	4,95	<i>Arabidopsis thaliana</i>	*
Não atribuído										
4	0,0185	Proteína de armazenamento da casca A	A0A067KNP8	61	13300	35198	9,84	7,82	<i>Jatropha curcas</i>	1,474
25	0,0020	Proteína de armazenamento da casca A	A0A067KNP8	63	23115	35198	5,40	7,82	<i>Jatropha curcas</i>	1,470
26	0,0009	Proteína com repetições pentatricopeptídeo At1g32415 mitocondrial	P0C7R0	56	23878	86159	4,39	6,01	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,292
54	0,0030	rRNA N-glicosidase	D0PWG0	70	33249	32940	5,59	8,54	<i>Jatropha curcas</i>	5,676
55	0,0173	Proteína similar à protease Ulp1	Q5JMY1	67	33511	28368	5,42	9,62	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	4,358
56	0,0246	Proteína OSIGBa0111114.3 com domínio nucleotídeo-pirofosforilase	Q01L63	66	33093	18852	5,19	5,29	<i>Oryza sativa Indica Group</i>	1,967
159	0,0000	rRNA N-glicosidase	D0PWG0	66	32589	32940	6,10	8,54	<i>Jatropha curcas</i>	*
173	0,0010	Proteína de armazenamento vegetativo 2	A0A067KXQ9	83	30830	32465	9,63	7,88	<i>Jatropha curcas</i>	*
175	0,0000	Proteína sem domínio conservado	A0A067L4W9	59	36439	45564	4,86	4,72	<i>Jatropha curcas</i>	*
187	0,0000	Fator C de replicação da DNA polimerase tipo III subunidade gamma-tau	B9S6E2	61	20242	88976	7,21	9,63	<i>Ricinus communis</i>	*
205	0,0067	Proteína hipotética JCGZ_06028	A0A067JK77	61	39174	22787	5,29	5,69	<i>Jatropha curcas</i>	*
Não identificado										
2	0,0302	No match	-	-	23885	-	4,61	-	<i>Jatropha curcas</i>	2,663
3	0,0003	No match	-	-	13508	-	3,26	-	<i>Jatropha curcas</i>	7,930
9	0,0019	No match	-	-	16393	-	9,77	-	<i>Jatropha curcas</i>	6,736
45	0,0451	No match	-	-	29870	-	5,75	-	<i>Jatropha curcas</i>	1,565
67	0,0027	No match	-	-	37537	-	5,86	-	<i>Jatropha curcas</i>	2,043
69	0,0230	No match	-	-	37454	-	5,71	-	<i>Jatropha curcas</i>	1,645
132	0,0131	No match	-	-	19750	-	8,88	-	<i>Jatropha curcas</i>	2,831
150	0,0155	No match	-	-	36537	-	5,27	-	<i>Jatropha curcas</i>	1,695
163	0,0441	No match	-	-	60341	-	4,83	-	<i>Jatropha curcas</i>	*
169	0,0003	No match	-	-	17770	-	6,40	-	<i>Jatropha curcas</i>	*

219 Com base nas análises de ontologia gênica foi possível agrupar as proteínas identificadas em
 220 diferentes categorias, relacionadas aos processos biológicos. Dessa forma, as DAPs foram agrupadas
 221 em 16 categorias, sendo fotossíntese, resposta ao estresse, desenvolvimento e organização celular,
 222 potencial redox, sinalização, metabolismo de DNA e RNA, transporte de elétrons
 223 mitocondrial/síntese de ATP, bem como metabolismo de proteína são comuns a ambos os genótipos
 224 (Figura 2). Proteína relacionada à categoria de miscelânea de funções celulares e de desenvolvimento
 225 foi identificada apenas em CNPAE218. Por outro lado, processos envolvidos com glicólise, o
 226 metabolismo de aminoácidos, transporte, metabolismo secundário e metabolismo C1 foram
 227 exclusivos de CNPAE183 (Figura 2).



228

229 Figura 2. Ontologia gênica das DAPs de folhas de dois genótipos de *Jatropha curcas* submetidos a 750 mM de NaCl.

230

231 Através da análise de enriquecimento as proteínas mais acumuladas em CNPAE183 foram
 232 significativamente enriquecidas nos processos metabólicos de ADP, de ribonucleotídeo, derivados de
 233 carboidratos e piruvato, bem como processos envolvidos com a biossíntese de ATP e resposta aos
 234 íons da família do metal (Tabela 4).

235

236 Tabela 4. Principais processos biológicos significativamente enriquecidos no genótipo CNPAE183 de *J. curcas*
 237 comparado à espécie modelo *Arabidopsis thaliana*.

CNPAE183		
Processo biológico GO	Número de genes	<i>p-value</i> _FDR
Processo metabólico de ribonucleotídeo	4	9.30E-06
Processo metabólico de ADP	3	1.26E-05
Resposta aos íons de metal	3	2.53E-05
Processo metabólico derivados de carboidratos	5	6.41E-05
Síntese de ATP acoplado ao transporte de prótons	2	1.98E-04
Processo metabólico de piruvato	2	1.98E-04

238 4 Discussão

239

240 *Metabolismo fotossintético*

241 A fotossíntese é um dos processos fisiológicos mais afetados e sensíveis às condições
 242 ambientais estressantes, como a alta concentração salina e déficit hídrico. No presente trabalho
 243 observou-se que ambos os genótipos acumularam proteínas envolvidas com o processo fotossintético.
 244 O genótipo mais tolerante apresentou 19 *spots* mais acumulados, incluindo três cópias da subunidade
 245 menor da RuBisCO (*spot* 6, 216 e 291, tabela 2), quatro cópias da subunidade maior da RuBisCO
 246 (*spots* 100, 143, 144 e 227, tabela 2) e duas RuBisCO ativase (*spots* 84 e 86, tabela 2). Essa última é
 247 uma enzima chave da regulação fotossintética [33], que atua na ativação e manutenção da atividade
 248 catalítica da RuBisCO [34], em uma reação dependente de ATP [35], podendo atuar ainda como
 249 chaperona durante situações de estresse, garantindo certas funções cloroplastidiais [35, 36]. O papel
 250 na manutenção da correta estrutura do complexo rubisco é particularmente importante em condições
 251 estressantes [37], e pode estar relacionado ao fenótipo tolerante observado no genótipo CNPAE183.
 252 Nesse contexto, o maior acúmulo de proteínas de fotossíntese está associado a contínua manutenção
 253 da função sob condições deletérias [38], fato que pode ser fundamental para recuperação, no final do
 254 período estressor.

255 Adicionalmente, CNPAE183 ainda apresentou maior acúmulo de proteínas envolvidas na
 256 estabilidade e manutenção do fotossistema II (PSII), como Fator HCF 136 de estabilidade/montagem
 257 do PSII (*spot* 146, tabela 2), e a proteína de evolução de oxigênio (*spot* 60, tabela 2). Essa última

258 desempenha papel importante na manutenção da atividade de PSII [39]. Dessa maneira, o maior
259 acúmulo dessas proteínas chave na produção energética e de integridade do aparato fotossintético
260 parecem contribuir com uma maior eficiência fotossintética no genótipo mais tolerante, sob condições
261 salinas.

262 Em CNPAE218, apenas foram identificadas e categorizadas em processo biológico duas como
263 RuBisCO, uma subunidade maior (*spot* 179, tabela 3) e uma subunidade menor (*spot* 119, tabela 3),
264 além de uma anidrase carbônica (CA) (*spot* 172, tabela 3), uma enzima que catalisa reversivelmente
265 CO₂ em bicarbonato. A resposta da atividade da CA varia de acordo com a genótipo, duração e
266 intensidade da condição estressante [40]. O maior acúmulo dessa enzima no genótipo mais sensível
267 sugere um maior investimento e necessidade de CNPAE218 em gerar substrato para a RuBisCO em
268 decorrência da menor eficiência fotossintética desse genótipo.

269 Relacionadas aos processos fotossintéticos, ainda estão envolvidas as enzimas ATP sintase
270 cloroplastidiais, incluindo as subunidades beta (*spot* 112 e 118, tabela 2) e alfa (*spot* 115 e 209, tabela
271 2), mais acumuladas no genótipo CNPAE183. Alterações ambientais podem afetar o processo
272 fotossintético, alterando a capacidade de produção de ATP e NADPH [41, 42]. Nesse sentido, a maior
273 eficiência fisiológica observada em CNPAE 183, sob estresse salino, pode estar relacionada ao maior
274 acúmulo de ATP sintase, indicando que o sistema de síntese de energética fotodependente, nesse
275 genótipo, apresentou menor prejuízo na presença do sal. Maior tradução dessa enzima foi relacionada
276 com adaptação ao estresse salino em trigo [43] e em mostarda-marrom [44], atendendo a demanda de
277 energia durante períodos de recuperação e desenvolvimento vegetal [45]. A importância da ATP
278 sintase no genótipo mais tolerante na presença do sal é corroborada pela análise de enriquecimento
279 de termos de ontologia gênica, com base na qual foi registrada variação significativa em dois
280 processos biológicos relacionados ao metabolismo energético: síntese de ATP acoplado ao transporte
281 de prótons, processo metabólico de ADP ($p \leq 1.98E-04$ e $1.26E-05$ respectivamente). Além disso,
282 maior concentração de tais proteínas também pode indicar menor degradação de membranas dos
283 tilacóides, mantendo produção energética parcial, bem como ajuste do pH do lúmen dos tilacóides.

284 Em ambientes acidificados, há maior ocorrência de agregação e degradação proteica [46], fato que
285 pode ser mitigado mais eficientemente no genótipo tolerante.

286

287 *Glicólise*

288 O metabolismo de carboidrato é uma das principais vias de fornecimento energético no
289 organismo. Plantas sob estresse salino apresentam, geralmente, redução na tradução de enzimas
290 relacionadas à esse processo [47], diferindo dos resultados observados nesse trabalho. Porém, alguns
291 trabalhos de expressão gênica têm mostrado maior indução de genes relacionados com as vias de
292 metabolismo de piruvato, como a piruvato quinase (PQ), em planta de arroz [48] e cana-de-açúcar
293 [49] submetidos a estresses abióticos, assim como observado no genótipo mais tolerante (*spot* 282,
294 tabela 2).

295 A piruvato quinase é uma enzima chave na regulação da glicólise, catalisando
296 irreversivelmente a formação de piruvato, garantindo substrato ao ciclo do ácido tricarboxílico
297 (TCA), e conseqüentemente para cadeia transportadora de elétrons e geração de metabólitos.
298 Corroborando a ideia da importância desses metabolismos para CNPAE183 em condições de estresse
299 salino, foi registrado enriquecimento significativo para processos metabólicos de piruvato e de
300 derivados de carboidratos ($p < value$ 1.98E-04 e 6.41E-05, respectivamente). Dessa maneira o maior
301 acúmulo dessas enzimas sugere que o genótipo CNPAE183 é capaz de lidar com a condição
302 estressante através do aumento de proteínas associadas ao metabolismo energético, não apresentando
303 comprometimento da via glicolítica [50, 51] e garantindo energia para as reações metabólicas bem
304 como precursores de carbono para a formação de macromoléculas importantes.

305

306 *Estresse*

307 Vários genes são induzidos pelo estresse salino, os quais codificam e acumulam proteínas que
308 atuam em diferentes vias metabólicas frente à condição estressante, bem como no controle e reparo
309 de danos celulares [52]. No presente estudo, foram encontradas duas proteínas diferentes entre

310 genótipos envolvidas com respostas ao estresse: proteína ubiquitina transferase (UQE3) (RING- tipo
311 E3) (*spot* 236, tabela 2) em CNPAE183 e proteína serina/treonina kinase SD1-8 isoforma X1 em
312 CNPAE218, envolvidas na sinalização em resposta à salinidade.

313 Assim como observado no genótipo mais tolerante, estudo anterior relata que *A. thaliana*
314 também apresentou maior expressão de UQE3, mediante alta concentração salina [53]. Segundo esses
315 autores, a maior expressão dessa classe de proteínas está intimamente relacionada com a via de
316 sinalização mediada pelo ABA [54] e estão envolvidas, principalmente, no mecanismo de degradação
317 das proteínas [55]. Enzimas da classe E3 ligases transferem a cadeia de poliubiquina para a proteína
318 alvo de degradação, que posteriormente é clivada pelo sistema 26 S proteassoma, o qual é geralmente
319 responsivo a situações de estresse abiótico em plantas [54].

320 Essas informações associadas com a maior tolerância observada nesse genótipo pode indicar
321 que CNPAE183, quando submetido ao estresse salino, aumentou a produção de UQE3, a qual é capaz
322 de promover a quebra de proteínas como uma fonte de renovação de aminoácidos necessários à
323 formação de novas proteínas [55], sendo assim uma estratégia vantajosa na manutenção celular.

324 Foi registrado ainda maior acúmulo de duas proteínas semelhantes a defensinas (*spots* 80, 94,
325 tabela 2) e uma proteína N de resistência ao TMV (PNRTMV) (*spot* 145, tabela 2) em CNPAE183.
326 É sabido que essas proteínas são associadas, principalmente, ao estresse biótico, considerando que
327 defensinas são polipeptídeos com atividade antimicrobiana[56] e a PNRTMV é mais acumulada na
328 presença do vírus mosaico do tabaco [7]. Outros trabalhos já relataram a atuação dessas proteínas sob
329 estresse abiótico, como déficit hídrico e salinidade [57]. Do, Lee, Jung et al. [58], avaliando a
330 expressão do gene CADF1 (*Capsicum annum* defensina 1) em folhas de pimenta, relatou maior
331 tolerância à condição salina, em plantas que mostraram maior expressão desse gene, demonstrando
332 que essa classe de proteínas exerce inúmeros papéis na defesa vegetal, os quais promovem maior
333 adaptação das plantas às condições ambientais adversas. A maior tradução de proteínas do sistema de
334 defesa vegetal em plantas submetidas a estresses abióticos pode estar relacionado a existência de rotas
335 de sinalização cruzadas, sendo comuns a ambos estresses, bióticos e abióticos [59].

Metabolismo redox

336
337 O estresse salino e hídrico estão intimamente relacionados ao estresse oxidativo, ocasionando
338 a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como radicais superóxido, peróxido de
339 hidrogênio (H₂O₂) e radicais hidroxila que podem comprometer o balanço redox celular, resultando
340 em danos oxidativo para muitos componentes e estruturas celulares [60]. Nesse sentido, a produção
341 de sistemas antioxidativos para combater essas EROs são ativados frente a condição estressante, a
342 fim de minimizar os danos. O sistema antioxidativo envolvido nesse processo, inclui o sistema
343 glutarredoxina e a via da catalase (CAT) [61]. Através do resultado desse trabalho foi possível
344 observar que os diferentes genótipos apresentaram diferentes vias de respostas no metabolismo redox.
345 Enquanto o genótipo CNPAE 218 apresentou acúmulo exclusivo da proteína da classe da
346 glutarredoxina (Grx) (*spot* 198, tabela 3), o genótipo mais tolerante acumulou catalase (CAT) (*spot*
347 231, tabela 2) sendo ambas as vias atuantes na eliminação do H₂O₂ [62-65].

348 A CAT é uma enzima presente nos peroxissomos/glioxissomos, contribuindo para a
349 eliminação de EROs formados nessas organelas, principalmente como resultantes de vias energéticas
350 alternativas como a fotorrespiração [65]. Diferente da CAT, as Grxs são proteínas que fazem parte do
351 ciclo da glutathione, sendo essa uma via NADPH-dependente [62, 63]. Dessa maneira, a diminuição
352 da produção de NADPH em situação de estresse pode comprometer essa via antioxidativa, sugerindo
353 que o genótipo mais sensível apresenta maior ativação de uma via menos eficiente na eliminação de
354 EROs, quando comparado à atividade da CAT, encontrada em CNPAE183.

355

Sinalização

357 A resposta vegetal frente ao estresse salino está relacionada à transdução de sinais celulares,
358 incluindo via iônica, osmótica, de desintoxicação e de coordenação da divisão e expansão celular [3].
359 A rede de sinalização dependente de Ca²⁺ é uma via iônica a qual pode ser induzida pelo estresse
360 salino, e está intimamente relacionada à modulação celular de níveis de Na⁺/K⁺ [66, 67], bem como
361 as alterações na concentração de íons de cálcio intracelular, desencadeado pelo aumento da

362 concentração de ABA [67], desempenhando um importante papel nas vias de sinalização contra
363 patógenos, doenças e de respostas ao estresse [66]. Essa via de sinalização foi ativada nos dois
364 genótipos de plantas jovens de pinhão-manso, nos quais foram identificadas proteínas ligantes a cálcio
365 (CML45) (*spot* 245, tabela 2 e *spot* 166 e 180, tabela 3). Além dessas, o genótipo mais sensível
366 apresentou maior acúmulo da quinase cálcio dependente (CDPK) 20 (*spot* 16, tabela 3).

367 Segundo Li, Wang, Leseberg, Jia and Mao [66], genes de CDPK respondem a altas
368 concentrações de EROs como o H₂O₂. Essa resposta, aliada com o maior acúmulo de CDPK em
369 CNPAE218, pode corroborar com a hipótese de que o genótipo mais sensível apresentou maior
370 acúmulo de EROs intracelular decorrente ao estresse salino, concentração essa controlada mais
371 eficientemente pela ação de enzimas antioxidativas como a CAT, identificada em CNPAE183.

372 Ambos os genótipos ainda apresentaram receptores quinase associados a parede celular tipo 4
373 (*spot* 246 e 271, tabela 2 e *spot* 36 e 184, tabela 3), os quais estão relacionados a primeira linha de
374 “sensores” de fatores de estresse localizados no apoplasto [68]. Seu papel na sinalização frente ao
375 estresse abiótico ainda não está completamente compreendido, porém em *A. thaliana* há registro de
376 maior produção de tais receptores quando submetida a altas concentrações salinas. [69]. Tais
377 receptores estão imersos nas camadas de polissacarídeos, e podem ter sua conformação alterada em
378 ambientes submetidos a alterações osmóticas e de turgor, iniciando as cascatas de sinalização através
379 de autofosforilações [70]. Mudanças da conformação de parede e membrana celular são eventos
380 comuns em células sob choque osmótico, e podem estar relacionados a percepção desse tipo de
381 estímulo, corroborando as condições experimentais dos genótipos testados.

382

383 ***Transporte***

384 Em relação ao transporte celular, o genótipo mais tolerante apresentou maior acúmulo da
385 proteína translocase de importação, localizada na membrana interna mitocondrial, subunidade TIM50
386 (*spot* 238, tabela 2). Essa subunidade faz parte de um complexo proteico (TIM17:23), o qual é o
387 principal responsável pela translocação da maioria do proteoma mitocondrial [71]. Evidências

388 indicam que essas proteínas, tanto da membrana externa (TOM) quanto da interna (TIM) também
389 estão envolvidas em outras funções, como a manutenção da morfologia mitocondrial, a regulação de
390 fissão e fusão da organela [72]. Nesse sentido, a eficiência no transporte intracelular é um importante
391 fator na manutenção da estrutura celular e garantia da homeostase sob estresse oxidativo [72].

392 Sendo assim, o maior acúmulo dessas vias de comunicação mitocondrial em CNPAE183 pode
393 indicar eficiência metabólica relacionadas, principalmente, no que diz respeito ao transporte de
394 substrato para a respiração celular, apresentando maior estabilidade e integridade de mitocôndria,
395 contribuindo para homeostase e desenvolvimento celular. A maior expressão de genes relacionados
396 a proteínas do sistema de importação mitocondrial após a exposição à condição de estresse biótico e
397 abiótico também foi relatada em plantas tolerante de *A. thaliana* [73]. Tal possibilidade é notadamente
398 importante em plantas sob estresse osmóticos, pois diversas rotas de ajuste como síntese de
399 osmoreguladores, osmoprotetores e aminoácidos ocorre nas mitocôndrias.

400

401 **RNA**

402 Os diversos mecanismos desencadeados pela planta, frente a uma condição estressante, são
403 mediados pela ativação de vias metabólicas e coordenadas por múltiplos sinais que envolvem
404 fitormônios, proteínas quinases, fosfatases, bem como, fatores de transcrição [67]. Esses últimos estão
405 envolvidos, principalmente, na capacidade de alterar a expressão de genes, alterando o estado
406 fisiológico geral da planta, podendo conferir maior adaptabilidade as condições ambientais [74].
407 Nesse sentido ambos os genótipos de *J. curcas* apresentaram fatores de transcrição responsivos à
408 salinidade, porém a eficiência fenotípica atribuída à CNPAE183 pode estar relacionada à maior
409 quantidade e diversidade de fatores de transcrição responsivos ao ABA, favorecendo maior
410 capacidade de regulação nesse genótipo, bem como maior percepção e ajuste frente ao estresse salino.

411 Além dos fatores de transcrição, outras proteínas foram categorizadas no metabolismo de
412 RNA e regulação da expressão gênica em ambos genótipos. Dentre essas, a Maturase K (MATK)
413 (*spot* 107, tabela 2 e *spot* 40, tabela 3) é uma importante proteína plastidial que está envolvida no

414 processo de *splicing* do pré-RNAm para a formação do RNAm maduro. A presença dessa proteína já
415 foi mencionada como sendo envolvida na resposta à condição salina [75, 76], induzindo a tolerância
416 por desempenhar um papel crucial na regulação pós-transcricional. Os resultados obtidos no trabalho
417 revelam que apesar da presença dessa proteína em ambos genótipos de *J. curcas*, é válido salientar
418 que a diferença da massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI) entre as MATKs identificadas nos
419 genótipos, sugere a formação de isoformas ou modificações sofridas por essas proteínas, as quais
420 podem ter favorecido CNPAE183 no processo de regulação gênica em resposta à salinidade. Esses
421 dados são corroborados pelo enriquecimento significativo encontrado nas proteínas envolvidas nos
422 processos de metabolismo de ribonucleotídeos.

423

424 **5 Considerações Finais**

425 Dados do proteoma revelam indícios dos principais processos moleculares regulados pela
426 condição salina, os quais parecem ser genótipo-dependentes. Dessa forma, os dados de análise
427 proteômica diferencial revelaram que o genótipo mais tolerante apresentou proteínas de diferentes
428 vias relacionadas a resposta à salinidade, incluindo produção de enzimas antioxidativas, bem como
429 de vias de sinalização e regulação de estresse, principalmente com alta sensibilidade e responsivas ao
430 ABA (Figura S1). Além disso, a maior eficiência fisiológica de CNPAE183 deve-se também pela sua
431 capacidade de produzir enzimas importantes de diferentes vias energéticas e metabólicas, como
432 fotossíntese e glicólise, garantindo o seu desenvolvimento.

433 Entre as proteínas relacionadas a etapas chave associadas a maior tolerância de CNPAE183,
434 está a ATPase, PK e proteínas relacionadas com a via de sinalização de cálcio, merecendo
435 investigações futuras mais aprofundadas. Estes resultados auxiliam, dessa maneira, para a
436 compreensão das respostas fisiológicas e moleculares associadas à maior tolerância do pinhão-mansão
437 ao estresse por salinidade, bem como à plasticidade fenotípica da espécie em resposta à salinidade.

438

439 **Referências Bibliográficas**

440 [1] A.K. Parida, A.B. Das, Salt tolerance and salinity effects on plants: a review, *Ecotox Environ Safe* 60(3) (2005) 324-
441 349.

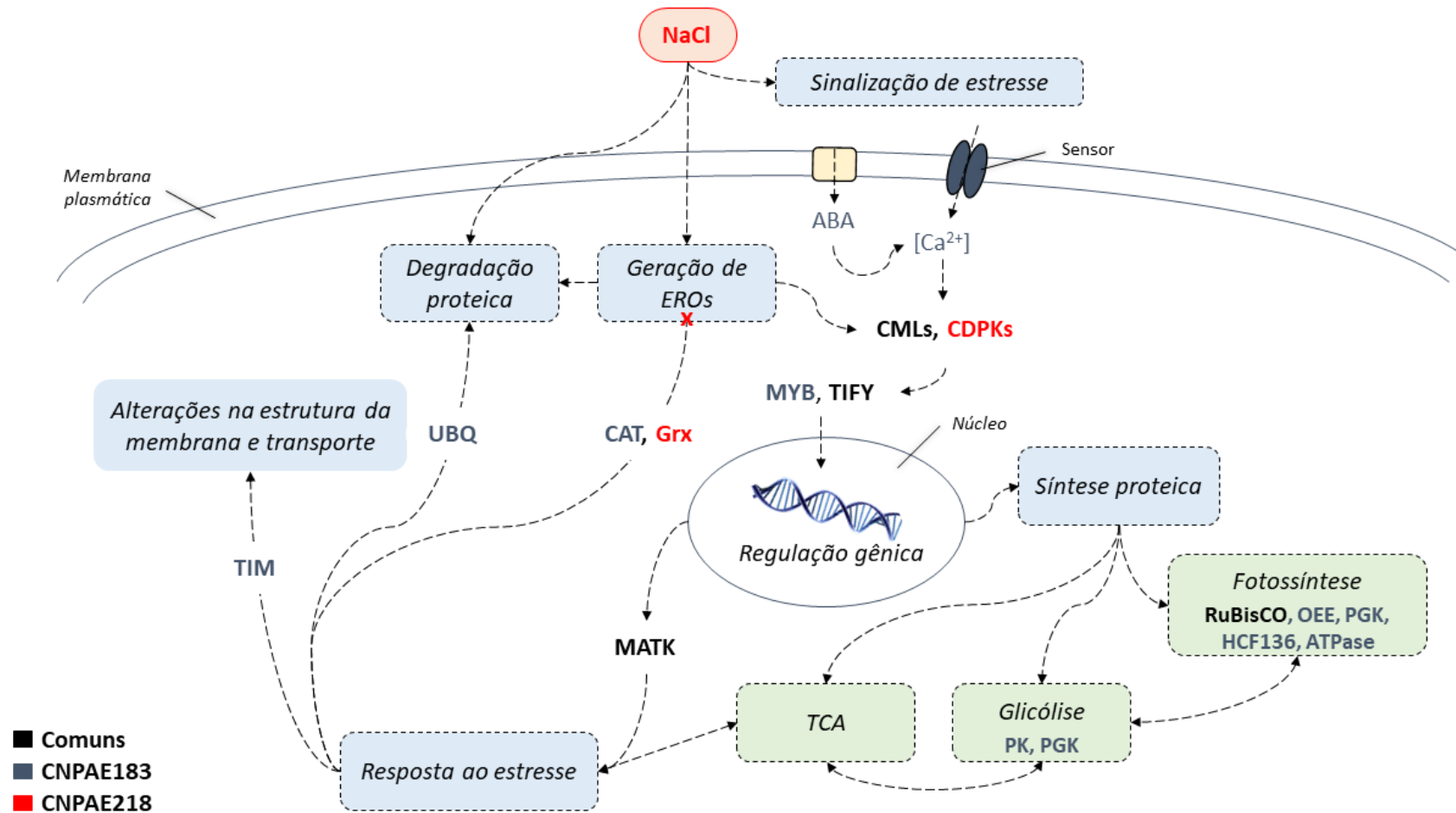
- 442 [2] S.J. Roy, S. Negrão, M. Tester, Salt resistant crop plants, *Curr Opin Biotechnol* 26(1) (2014) 115 - 124.
- 443 [3] J.-K. Zhu, Salt and drought stress signal transduction in plants, *Annu Rev Plant Biol* 53(1) (2002) 247-273.
- 444 [4] J.M. Cheeseman, Mechanisms of salinity tolerance in plants, *Plant Physiol* 87(3) (1988) 547-550.
- 445 [5] A. Mostek, A. Borner, A. Badowiec, S. Weidner, Alterations in root proteome of salt-sensitive and tolerant barley
- 446 lines under salt stress conditions., *J Plant Physiol* 174 (2015) 166-176.
- 447 [6] T. Kurusu, K. Kuchitsu, Y. Tada, Plant signaling networks involving Ca²⁺ and Rboh/Nox-mediated ROS
- 448 production under salinity stress., *Front Plant Sci* 6 (2015) 427.
- 449 [7] L. Zhang, C. Zhang, P. Wu, Y. Chen, M. Li, H. Jiang, G. Wu, Global analysis of gene expression profiles in physic
- 450 nut (*Jatropha curcas* L.) seedlings exposed to salt stress, *PLOS ONE* 9(5) (2014) e97878.
- 451 [8] H. Abe, K. Yamaguchi-Shinozaki, T. Urao, T. Iwasaki, D. Hosokawa, K. Shinozaki, Role of *Arabidopsis* MYC and
- 452 MYB homologs in drought- and abscisic acid regulated gene expression, *Plant Cell* 9(10) (1997) 1859-1868.
- 453 [9] C. Jonak, S. Kiegerl, W. Ligterink, P.J. Barker, N.S. Huskisson, H. Hirt, Stress signalling in plants: A mitogen-
- 454 activated protein kinase pathway is activated by cold and drought, *Proc Nat Acad Sci USA* 93(20) (1996) 11274-11279.
- 455 [10] Y. Cheng, Y. Qi, Q. Zhu, X. Chen, N. Wang, X. Zhao, H. Chen, X. Cui, L. Xu, W. Zhang, New changes in the
- 456 plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress, *Proteomics* 9(11) (2009) 3100-3114.
- 457 [11] C.M. Santos, V. Veríssimo, H.C.L. Wanderley-Filho, V.M. Ferreira, P.G.S. Cavalcante, E.V. Rolim, L. Endres,
- 458 Seasonal variations of photosynthesis, gas exchange, quantum efficiency of photosystem II and biochemical responses
- 459 of *Jatropha curcas* L. grown in semi-humid and semi-arid areas subjected to water stress, *Ind Crops Prod* 41(1) (2013)
- 460 203-213.
- 461 [12] E.N. Silva, S.L.F. Silva, R.A. Viégas, J.A.G. Silveira, The role of organic and inorganic solutes in the osmotic
- 462 adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants, *Environ Exp Bot* 69(3) (2010) 279-285.
- 463 [13] C.-Y. Yang, X. Deng, Z. Fang, D.P. Peng, Selection of high-oil-yield seed sources of *Jatropha curcas* L for
- 464 biodiesel production, *Adv Biochem Eng Biot* 1(5) (2010) 705-717.
- 465 [14] W.M.J. Achten, E. Mathijs, L. Verchot, V.P. Singh, R. Aerts, B. Muys, *Jatropha* biodiesel fueling sustainability?,
- 466 *Biofuel, Bioprod. Bior.* 1 (2007) 283-291.
- 467 [15] B.R. Rocha, B.G. Laviola, D.A.S. Silva, P.A.C. Juház, J.C. Albrecht, B.T. Rosado, Adaptabilidade e estabilidade
- 468 de progênes de meios-irmãos de pinhão-mansão em diferentes regiões do Brasil., *Rev Ceres* 63 (2016) 174-182.
- 469 [16] W.H. Maes, A. Trabucco, W.M.J. Achten, B. Muys, Climatic growing conditions of *Jatropha curcas* L., *Biomass*
- 470 *Bioenerg* 33(10) (2009) 1481-1485.
- 471 [17] M. Shah, E.L. Soares, P.C. Carvalho, A.A. Soares, G.B. Domont, F.C.S. Nogueira, F.A.P. Campos, Proteomic
- 472 analysis of the endosperm ontogeny of *Jatropha curcas* L. seeds, *J Proteome Res* 14(6) (2015) 2557-2568.
- 473 [18] M. Shah, E.L. Soares, M.L.B. Lima, C.B. Pinheiro, A.A. Soares, G.B. Domont, F.C.S. Nogueira, F.A.P. Campos,
- 474 Deep proteome analysis of gerontoplasts from the inner integument of developing seeds of *Jatropha curcas*, *J*
- 475 *Proteomics* 143 (2016) 346-352.
- 476 [19] E.L. Soares, M. Shah, A.A. Soares, J.H. Costa, P. Carvalho, G.B. Domont, F.C.S. Nogueira, F.A.P. Campos,
- 477 Proteome analysis of the inner integument from developing *Jatropha curcas* L. seeds, *J Proteome Res* 13(8) (2014)
- 478 3562-3570.
- 479 [20] H. Liu, Z. Yang, M. Yang, S. Shen, The differential proteome of endosperm and embryo from mature seed of
- 480 *Jatropha curcas*, *Plant Sci* 181(6) (2011) 660-666.
- 481 [21] H. Liu, Y.J. Liu, M.F. Yang, S.H. Shen, A comparative analysis of embryo and endosperm proteome from seeds of
- 482 *Jatropha curcas*, *J IntegrPlant Biol* 51(9) (2009) 850-857.
- 483 [22] C.B. Pinheiro, M. Shah, E.L. Soares, F.C.S. Nogueira, P.C. Carvalho, M. Junqueira, G.D.T. Araújo, A.A. Soares,
- 484 G.B. Domont, F.A.P. Campos, Proteome analysis of plastids from developing seeds of *Jatropha curcas* L., *J Proteome*
- 485 *Res* 12(11) (2013) 5137-5145.
- 486 [23] M.F. Yang, Y.J. Liu, Y. Liu, H. Chen, F. Chen, S.H. Shen, Proteomic analysis of oil mobilization in seed
- 487 germination and postgermination development of *Jatropha curcas*, *J Proteome Res* 8(3) (2009) 1441-1451.
- 488 [24] S. Pobluechai, M. Froissard, P. Jolivet, D. Breviario, A.M.R. Gatehouse, A.G.O. O'Donnel, T. Chardot, A. Kohli,
- 489 *Jatropha curcas* oil body proteome and oleosins: L-form JcOle3 as a potential phylogenetic marker, *Plant Physiol Bioch*
- 490 49(3) (2011) 352-356.
- 491 [25] H. Liu, C. Wang, F. Chen, S. Shen, Proteomic analysis of oil bodies in mature *Jatropha curcas* seeds with different
- 492 lipid content, *J Proteom* 13 (2015) 403-414.
- 493 [26] H. Liu, C. Wang, S. Komatsu, M. He, G. Liu, S. Shen, Proteomic analysis of the seed development in *Jatropha*
- 494 *curcas*: From carbon flux to the lipid accumulation, *J Proteom* 91 (2013) 23-40.
- 495 [27] E. Epstein, Mineral nutrition of plants: principles and perspectives, John Wiley & Sons, New York, 1972.
- 496 [28] X. Wu, E. Xiong, W. Wang, M. Scali, M. Cresti, Universal sample preparation method integrating trichloroacetic
- 497 acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis., *Nat Protoc* 9(2) (2014) 362-374.
- 498 [29] M. Bradford, Rapid and quantitative method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the
- 499 principle of protein-dye binding, *Anual Biochem* 72 (1976) 284-252.
- 500 [30] C.M. Pacheco, M.C. Pestana-Calsa, F.C. Gozzo, R.J.M.C. Nogueira, M. Menossi, T. Calsa Jr, Differentially
- 501 proteome responses to salt stress in sugarcane varieties., *J Proteome Res* 12(12) (2013) 5681-5695.
- 502 [31] G. Candiano, M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G.M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi, P.G.
- 503 Righetti, Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis, *Electrophoresis* 25(9)
- 504 (2004) 1327-1333.

- 505 [32] S. Souza, Análise do proteoma de raízes de cana-de-açúcar e da expressão de uma peroxidase apoplástica
506 responsiva à micorriza arbuscular, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo,
507 Piracicaba, 2006, p. 100.
- 508 [33] M.A.J. Parry, P.J. Andralojc, R.A.C. MITCHELL, P.J. Madgwick, A.J. Keys, Manipulation of RuBisCO: the
509 amount, activity, function and regulation, *J Exp Bot* 54 (2003) 1321-1333.
- 510 [34] Z. Zhu, J. Chen, H.L. Zheng, Physiological and proteomic characterization of salt tolerance in a mangrove plant,
511 *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lam., *Tree Physiol* 32(11) (2012) 1378-11388.
- 512 [35] J.Y. Bhat, G. Thieulin-Pardo, F.U. Harti, M. Hayer-Harti, Rubisco activases: AAA+chaperones adapted to enzyme
513 repair, *Front Mol Biosci* 4(20) (2017) 1-10.
- 514 [36] A. Rokka, L. Zhang, E.-M. Aro, Rubisco activase: an enzyme with a temperature-dependent dual function?, *Plant J*
515 25(4) (2001) 463-471.
- 516 [37] Y. Chen, X.-M. Wang, L. Zhou, Y. He, D. Wang, Y.-H. Qi, C.-D. Jiang, Rubisco activase is also a multiple
517 responder to abiotic stresses in rice, *PLOS ONE* 10(10) (2015).
- 518 [38] J.Y. Bhat, G. Miličić, G. Thieulin-Pardo, A. Bracher, A. Maxwell, S. Ciniawsky, O. Mueller-Cajar, J.R. Engen,
519 F.U. Hartl, P. Wandler, M. Hayer-Hartl, Mechanism of enzyme repair by the AAA⁺ chaperone rubisco activase., *Mol*
520 *Cel* 67(5) (2017) 744-756.
- 521 [39] K. Sugihara, N. Hanagata, Z. Dubinsky, S. Baba, I. Karube, Molecular characterization of cDNA encoding oxygen
522 evolving enhancer protein 1 increased by salt treatment in the mangrove *Bruguiera gymnorhiza*, *Plant Cell Physiol*
523 41(11) (2000) 1279-1285.
- 524 [40] A. Azeem, Y. Wu, D. Xing, Q. Javed, I. Ullah, Photosynthetic response of two okra cultivars under salt stress and
525 re-watering, *J Plant Interac* 12(1) (2017) 67-77.
- 526 [41] M.A. Schottler, S.Z. Toth, A. Boulouis, S. Kahlau, Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher
527 plants: biogenesis, function, and turnover of ATP synthase and the cytochrome b(6)f complex. , *J Exp Bot* 66(2373-
528 2400) (2015).
- 529 [42] R. Razavizadeh, A.A. Ehsanpour, N. Ahsan, S. Komatsu, Proteome analysis of tobacco leaves under salt stress,
530 *Peptides* 30 (2009) 1651-1659.
- 531 [43] M.C. Wang, Z.Y. Peng, C.L. Li, F. Li, C. Liu, G.M. Xia, Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression
532 strain of *Triticum aestivum/Thinopyrum ponticum*, *Proteomics* 8(7) (2008) 1470-1489.
- 533 [44] P.Y. Yousuf, A. Ahmad, I.M. Aref, M. Ozturk, Hemant, A.H. Ganie, M. Iqbal, Salt-stress-responsive chloroplast
534 proteins in *Brassica juncea* genotypes with contrasting salt tolerance and their quantitative PCR analysis, *Protoplasma*
535 253(6) (2016) 1565-1575.
- 536 [45] P. Han, X. Lu, F. Mi, J. Dong, C. Xue, J. Li, B. Han, X. Zhang, Proteomic analysis of heterosis in the leaves of
537 sorghum-sudangrass hybrids, *Acta Biochim Biophys Sin* 48(2) (2016) 161-173.
- 538 [46] M. Farooq, A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita, S.M.A. Basra, Plant drought stress: effects, mechanisms and
539 management, *Agron Sustain Dev* 29(1) (2009) 185-212.
- 540 [47] K. Kosová, P. Vítámvás, I.T. Prásil, J. Renaut, Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of
541 proteomics studies to understanding plant stress response, *J Proteom* 74 (2011) 1301-1322.
- 542 [48] K.J. Lee, S.-J. Kwon, J.E. Hwang, S.M. Han, I. Jung, J.-B. Kim, H.-I. Choi, J. Ryu, S.-Y. Kang, Genome-wide
543 expression analysis of a rice mutant line under salt stress, *Genet Mol Res* 15(4) (2016) 1-15.
- 544 [49] C. Li, Q. Nong, M.K. Solanki, Q. Liang, J. Xie, X. Liu, Y. Li, W. Wang, L. Yang, Y. Lib, Differential expression
545 profiles and pathways of genes in sugarcane leaf at elongation stage in response to drought stress, *Sci Rep* 6 (2016)
546 25698.
- 547 [50] Q. Pang, S. Chen, S. Dai, Y. Chen, Y. Wang, X. Yan, Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis*
548 *thaliana* and *Thellungiella halophila*, *J. Prot. Res.* 9 (2010) 2584-2599.
- 549 [51] Q.-L. Ma, J.-M. Kang, R.-M. Long, Y.-J. Cui, T.-J. Zhang, J.-B. Xiong, Q.-C. Yang, Y. Sun, Proteomic analysis of
550 salt and osmotic-drought stress in alfalfa seedlings, *J Integr Agric* 15(10) (2016) 2266-2278.
- 551 [52] A. Muñoz-Mayor, B. Pineda, J.O. Garcia-Abellán, T. Antón, B. Garcia-Sogo, P. Sanchez-Bel, F.B. Flores, A.
552 Atarés, T. Angosto, J.A. Pintor-Toro, V. Moreno, M.C. Bolarin, Overexpression of dehydrin *tas14* gene improves the
553 osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato., *J Plant Physiol* 169 (2012) 459-468.
- 554 [53] Y. Zhang, C. Yang, Y. Li, N. Zheng, H. Chen, Q. Zhao, T. Gao, H. Guo, Q. Xie, SDIR1 is a RING Finger E3
555 ligase that positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 19 (2007) 1912-1929.
- 556 [54] H. Zhang, F. Cui, Y. Wu, L. Lou, L. Liu, M. Tian, Y. Ning, K. Shu, S. Tang, Q. Xie, The RING finger ubiquitin E3
557 Ligase SDIR1 targets SDIR1-INTERACTING PROTEIN1 for degradation to modulate the
558 salt stress response and ABA signaling in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 27 (2015) 214-227.
- 559 [55] L. Taiz, E. Zeiger, *Fisiologia Vegetal*, 4. ed., Artmed, Porto Alegre, 2009.
- 560 [56] T.M.A. Shafee, F.T. Lay, T.K. Phan, M.A. Anderson, M.D. Hulett, Convergent evolution of defensin sequence,
561 structure and function, *Cell Mol Life Sci* 74 (2017) 663-682.
- 562 [57] F.T. Lay, M.A. Anderson, Defensins--components of the innate immune system in plants., *Curr Protein Pept Sci*
563 6(1) (2005) 85-101.
- 564 [58] H.M. Do, S.C. Lee, H.W. Jung, K.H. Sohn, B.K. Hwang, Differential expression and in situ localization of a
565 pepper defensin (CADEF1) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in
566 *Capsicum annuum*. , *Plant Sci* 166 (2004) 1297-1305.

- 567 [59] N. Nejat, N. Mantri, Plant immune system: Crosstalk between responses to biotic and abiotic stresses the missing
568 link in understanding plant defence, *Curr Issues Mol Biol* 23 (2017) 1-16.
- 569 [60] P. Mishra, S.M. Prasad, Mounting insights over human wellness by utilizing plant's primed defense against
570 precise/mild oxidative stress, *Crop Res* 51(1) (2016) 1-10.
- 571 [61] H. Zhang, B. Han, T. Wang, S. Chen, H. Li, Y. Zhang, S. Dai, Mechanisms of plant salt response: Insights from
572 proteomics., *J Proteome Res* 11 (2012) 49-67.
- 573 [62] N. Rouhier, J. Couturier, J.-P. Jacquot, Genome-wide analysis of plant glutaredoxin systems, *J Exp Bot* 57(8)
574 (2006) 1685-1696.
- 575 [63] N. Rouhier, E. Gelhaye, J.-P. Jacquot, Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems, *CMLS, Cell. Mol.*
576 *Life Sci.* 61 (2004) 1266-1277.
- 577 [64] M.R. Barbosa, M.M.A. Silva, L. Willadino, C. Ulisses, T.R. Câmara, Geração e desintoxicação enzimática de
578 espécies reativas de oxigênio em plantas., *Ciêñ Rural* 44(3) (2014) 453-460.
- 579 [65] A. Baxter, R. Mittler, N. Suzuki, ROS as key players in plant stress signalling, *J Exp Bot* 19 (2013) 1-12.
- 580 [66] A. Li, X. Wang, C.H. Leseberg, J. Jia, L. Mao, Biotic and abiotic stress responses through calcium-dependent
581 protein kinase (CDPK) signaling in wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Signal Behav* 3(9) (2008) 654-656.
- 582 [67] A. Trivellinia, M. Lucchesinib, A. Ferrante, G. Carmassib, G. Scatenaa, P. Vernierib, A. Mensuali-Sodia, Survive
583 or die? A molecular insight into salt-dependant signaling network, *Environ Exp Bot* 132 (2016) 140-153.
- 584 [68] H.L. Gall, F. Philippe, J.-M. Domon, F. Gillet, J. Pelloux, C. Rayon, Cell wall metabolism in response to abiotic
585 stress, *Plants* 4(1) (2015) 112-166.
- 586 [69] X. Hou, H. Tong, J. Selby, J. Dewitt, X. Peng, Z.H. He, Involvement of a cell wall-associated kinase, WAKL4, in
587 *Arabidopsis* mineral responses, *Plant Physiol* 139(4) (2005) 1704-1716.
- 588 [70] T. Yoshida, J. Mogami, K. Yamaguchi-Shinozaki, ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to
589 osmotic stress in plants., *Curr Opin Plant Biol* 21 (2014) 133-139.
- 590 [71] O. Duncan, M.W. Murcha, J. Whelan, Unique components of the plant mitochondrial protein import apparatus,
591 *Biochim Biophys Acta* 1833 (2013) 304-313.
- 592 [72] M. Fullerton, U.K. Singha, M. Duncan, M. Chaudhuri, Down regulation of Tim50 in *Trypanosoma brucei*
593 increases tolerance to oxidative stress, *Mol Biochem Parasitol* 199(0) (2015) 9-18.
- 594 [73] R. Lister, O. Chew, M.N. Lee, J.L. Heazlewood, R. Clifton, K.L. Parker, A.H. Millar, J. Whelan, A transcriptomic
595 and proteomic characterization of the *Arabidopsis* mitochondrial protein import apparatus and its response to
596 mitochondrial dysfunction., *Plant Physiol* 134 (2004) 777-789.
- 597 [74] Q. Shen, L. Fu, F. Dai, L. Jiang, G. Zhang, D. Wu, Multi-omics analysis reveals molecular mechanisms of shoot
598 adaption to salt stress in Tibetan wild barley, *BMC Genomics* 17 (2016) 889.
- 599 [75] C. Zorb, S. Schmitt, K.H. Muhling, Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth
600 conditions, *Proteomics* 10 (2010) 4441-4449.
- 601 [76] W. Xu, H. Lv, M. Zhao, Y. Li, Y. Qi, Z.H. Peng, G. Xia, M. Wang, Proteomic comparison reveals the contribution
602 of chloroplast to salt tolerance of a wheat introgression line, *Sci Rep* 6 (2016) 1038.
- 603

604

Material suplementar



605

606 Figura S1. Modelo proposto para vias de modulação da regulação gênica da resposta ao estresse de dois genótipos de *J. curcas* em resposta a 48 horas submetido à 750 mM de NaCl.
 607 ABA- ácido abscísico; CMLs – Proteína ligante ao cálcio; CDPKs – Quinase cálcio-dependente; MYB – Fator de transcrição da família MYB; TIFY – Fator de transcrição da família
 608 TIFY; RuBisCO – Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase; OEE – Proteína de evolução do oxigênio; PGK – Fosfoglicerato quinase; HCF136 – Fator de estabilidade/montagem
 609 do PSII; ATPase – ATP sintase; PK – Piruvato quinase; MATK – Maturase K; TIM – Translocase de membrana interna mitocondrial; UBQ – Ubiquitina transferase; CAT – Catalase;
 610 Grx – Glutarredoxina

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cenário atual de grandes transformações ambientais tem incentivado cada vez mais na busca da compreensão dos diferentes mecanismos de tolerância principalmente, de espécies vegetais de importância econômica. Nesse sentido, estudos multidisciplinares se fazem necessários na busca do conhecimento em termos fisiológicos, bioquímicos e moleculares dessa complexa rede de eventos. Nos últimos anos houve grande avanço na elucidação nos mecanismos de sinalização, expressão gênica e rotas bioquímicas visando a seleção de espécies modelo utilizado no melhoramento genético.

Ao longo do trabalho foi possível identificar e sugerir as diferentes vias das respostas de genótipos de *J. curcas* submetidos a altas concentrações salinas. Os aspectos fenotípicos resultantes das análises fisiológicas do artigo I, revelaram que genótipos de *J. curcas* apresentam diferentes respostas e mecanismos de tolerância ao estresse salino. Esses resultados puderam ser corroborados e compreendidos, através da análise proteômica do artigo II, elucidando as principais rotas investidas e regulação gênica entre genótipos potencialmente relacionadas, nos primeiros dias de estresse.

Os principais mecanismos de tolerância da *J. curcas* estão associados, principalmente, a manutenção de vias energéticas e a um sistema antioxidante eficiente. Nesse trabalho, os dados do capítulo I revelaram o quanto o genótipo CNPAE218 teve as taxas fotossintéticas alteradas pela presença do sal, resultando na morte das plantas em condições ambientais mais desfavoráveis. Entretanto, CNPAE183 conseguiu apresentar uma rápida recuperação da fotossíntese depois da supressão da condição estressante. Esses dados, assegurados pelas evidências do estudo do proteoma, evidenciaram que isso foi possível pela maior estabilidade e atividade na regulação durante o máximo estresse. Com relação a vias antioxidantes foi possível observar que o genótipo mais tolerante apresentou possivelmente maior eficiência na eliminação de EROs, intermediada maior acúmulo da CAT, sendo essa indicada como principal via antioxidante para *J. curcas* frente ao estresse salino nas condições aqui testadas.

Por fim, é possível indicar o genótipo CNPAE183 como recurso genético para futuros trabalhos de melhoramento, visando a produção em solos salinizados como encontrados em regiões áridas e semiáridas. Além disso, sugere-se a utilização de proteínas como o fator de transcrição AS1, e a enzima CAT como potenciais biomarcadores de tolerância da espécie ao estresse salino.