



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



MARIA FERNANDA DA COSTA GOMES

**TRANSCRIPTÔMICA DE PROTEÍNAS DE TRANSPORTE DE MEMBRANA EM  
RAIZ DE PINHÃO MANSO SOB SALINIDADE**

Recife

2021

MARIA FERNANDA DA COSTA GOMES

**TRANSCRIPTÔMICA DE PROTEÍNAS DE TRANSPORTE DE MEMBRANA EM  
RAIZ DE PINHÃO MANSO SOB SALINIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Biotecnologia e Bioinformática

**Orientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Éderson Akio Kido.

**Coorientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto.

Recife

2021

Catálogo na Fonte:  
Elaine C Barroso CRB-4/1728

Gomes, Maria Fernanda da Costa

Transcriptômica de proteínas de transporte de membrana em raiz de pinhão manso sob salinidade / Maria Fernanda da Costa Gomes – 2021.

95 f.: il., fig., tab.

Orientador: Éderson Akio Kido

Coorientador: José Ribamar Costa Ferreira Neto

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

Inclui referências e anexos.

1. Euphorbiaceae 2. Estresse oxidativo 3. Proteínas de transporte I. Kido, Éderson Akio (orient.) II. Ferreira Neto, José Ribamar da Costa (coorient.) III. Título

583.69

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-358

MARIA FERNANDA DA COSTA GOMES

**TRANSCRIPTÔMICA DE PROTEÍNAS DE TRANSPORTE DE MEMBRANA EM  
RAIZ DE PINHÃO MANSO SOB SALINIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Biotecnologia e Bioinformática

Aprovada em: 24/08/2021.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Éderson Akio Kido (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Marcelo Francisco Pompelli (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Flávia Figueira Aburjaile (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Minas Gerais

---

Dr. Wilson José da Silva Júnior (Examinador Externo)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Dedico*

*Aos meus pais, Pedro e Lenilda Gomes, e meus irmãos, Fernando e Carlos Adriano Gomes, por todo amor, confiança e apoio.*

## **AGRADECIMENTOS**

Sou grata a Deus e ao universo pela oportunidade de viver essa experiência tão desafiadora. Além disso, agradeço imensamente às pessoas especiais que me fizeram persistir e fazem parte desta conquista.

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Pedro e Lenilda Gomes, pelo amor, sabedoria e confiança. Vocês são meus maiores exemplos de seres humanos e dedicação, obrigada por tornarem esse sonho possível. Agradeço aos meus irmãos, Fernando e Carlos Adriano Gomes, pelo exemplo que são e por terem investido junto comigo. Agradeço à minha avó, Antônia Mocinha, e minha tia Elzanira, por todo o carinho; e ao meu primo irmão Marcelo Moura e Suzane Mendes por serem tão presentes e amigos.

À minha amiga irmã, Gizele Luz, com quem tive o prazer de compartilhar diariamente essa jornada. Gizele brilha pela sua simplicidade e por ser tão autodidata. Obrigada por me ensinar e inspirar tanto. Agradeço à minha amiga Eliene que sempre esteve comigo, mesmo à distância, e que na sua maneira de ouvir e de usar as palavras certas me inspira a ser uma pessoa melhor.

Agradeço aos melhores amigos, Rafael Araújo, Willyanna Fernandes, Wânia Lima, Ronielton Costa, Beatriz Rodrigues, Fabiano Rodrigues e Sacha Aguiar que torcem por mim e que me inspiram com suas trajetórias de vida. Sou grata aos amigos Marcones Costa, Lívia Martins e Artemisa Borges que foram muito importantes, principalmente, no processo de mudança e adaptação em Recife. Agradeço à Eduarda Gomes e Alice Rocha pela parceria diária e boa convivência no nosso eterno apartamento F 202.

Agradeço aos meus colegas de trabalho do curso de Biologia da UESPI de São Raimundo Nonato-PI, Leonardo Ribeiro, Sheila Milena, Marla Ariane e Solrrany Castro, pelo apoio e suporte necessário para a finalização desta etapa. Agradeço imensamente aos amigos especiais que São Raimundo Nonato me concedeu, Cristiane Marcelo, Gustavo Durão, Patrícia Rodrigues e Mona Ayala, por todo o carinho.

Agradeço aos colegas do LGM (Laboratório de Genética Molecular), em especial a Marislane Souza pela acolhida e Élvia Jéssica pela parceria na bancada, vocês fizeram os dias no laboratório mais alegres. E a todos que tive o prazer de conhecer e conviver ao longo desses quatro anos, Manassés, Kátia, Natália, George, Vinícius, Valquíria, Vanessa, Rahysa, Jorge, Marilha Franciele e Bruna.

Agradeço ainda ao seu Romildo e aos colegas do LGBV (Laboratório de Genética e Biologia Vegetal), em especial à Vanessa, Flávia e Thamara. Obrigada pela partilha e boa convivência.

Agradeço ao meu orientador, professor Ederson Kido por todo apoio e ensinamentos que me tornaram uma profissional melhor. Sou muito grata ao José Ribamar Neto, um exemplo de pesquisador que foi essencial desde o início. Muito obrigada por ser tão solícito e pelos desafios que me fizeram crescer.

Por fim, agradeço a todos os professores e membros do PPGCB, à UFPE e à Capes pelo suporte técnico, científico e financeiro, indispensáveis para a realização desse trabalho.

*“Por isso uma força me leva a cantar  
Por isso essa força estranha  
Por isso é que eu canto, não posso parar  
Por isso essa voz tamanha...”  
(Caetano Veloso)*

## RESUMO

O pinhão manso (*Jatropha curcas*) é uma oleaginosa com grande potencial para a produção de biocombustíveis principalmente em regiões áridas. Entretanto é comum a ocorrência de solos salinos nessas áreas, o que compromete a produtividade dessa espécie. Proteínas de transporte de membrana (PTM) incluem diversas famílias multigênicas que desempenham papel importante na tolerância à salinidade. Assim, identificamos e analisamos a expressão do transportoma (várias famílias de PTM) em raízes de acessos contrastantes de pinhão manso (Jc171 e Jc183) sob salinidade (3h; 150 mM NaCl) via RNA-Seq. Por meio de alinhamento BLASTx ( $e\text{-value} \leq 1e-10$ ) e análise de domínio, identificamos 2279 potenciais transcritos PTM, associados a 61 famílias. As famílias F-ATPase (332), MC (Mitochondrial Carrier - 299), ABC (ATP-binding Cassette - 277) e MFS (Major Facilitator Superfamily - 182) destacaram-se por apresentarem os maiores números de transcritos identificados, representando aproximadamente 48% do transportoma. O número de unigenes diferencialmente expressos (DEGs) em Jc171 e Jc183 foi respectivamente, 116 e 01 ( $p\text{-value} \leq 0,0001$ ,  $FDR \leq 0,005$ ,  $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$  or  $\leq -1$ ). A não modulação dos genes codificadores de PTM pelo acesso Jc183 pode ter ocorrido por representar um genótipo tolerante a concentrações bem superiores de NaCl. A modulação transcricional foi notória pelo acesso Jc171 (sensível) no qual destaca-se a indução das famílias: MFS (08), MC (08) e F-ATPase (08) e MIP (Major Intrinsic Protein - 22). As F-ATPases atuam no sequestro vacuolar de  $\text{Na}^+$  e minimizam o estresse oxidativo, enquanto os transportadores mitocondriais (MC) reduzem os níveis de ROS mitocondrial. Por sua vez, os transportadores de açúcar (MFS) reforçam o ajuste osmótico, a reabsorção de monossacarídeos e mantêm a estabilidade da membrana celular, enquanto as aquaporinas (MIP) contribuem para o acúmulo de prolina e enzimas antioxidantes, facilitando a desintoxicação de ROS. A família MIP, proteínas chamadas de aquaporinas (AQPs), apresentou o maior número de unigenes induzidos correspondentes às subfamílias: PIP (*Plasma Membrane Intrinsic Proteins* - 15), TIP (*Tonoplast Intrinsic Proteins* - 6) e SIP (*Small Basic Intrinsic Proteins* - 1). A regulação diferencial desses transportadores contribui para o ajuste osmótico, redução do estresse oxidativo e da toxicidade iônica; e manutenção do balanço hídrico sob condições salinas. Nosso trabalho demonstra a atuação dos genes PTM na resposta adaptativa do pinhão manso à salinidade.

**Palavras-chave:** Estresse abiótico; *Jatropha curcas*; RNA-Seq.

## ABSTRACT

Physic nut (*Jatropha curcas*) is an oilseed with high potential for the production of biofuels, especially in arid regions. However, the common occurrence of saline soils in these areas compromises the productivity of this species. Membrane transport proteins (MTP) include several multigenic families that play an important role in ionic homeostasis and salt tolerance. Thus, we identify and analyze the expression of MTP genes in roots from contrasting accessions of *J. curcas* (Jc171 and Jc183) under salinity (3h; 150 mM NaCl) through RNA-Seq analyses. BLASTx alignment ( $e\text{-value} \leq 1e-10$ ) and domain analysis identify a transportome comprising 2,279 MTP transcripts (61 families). Among all families, F-ATPase (332), MC (Mitochondrial Carrier - 299), ABC (ATP-binding Cassette - 277) and MFS (Major Facilitator Superfamily - 182) stood out for presenting the highest number of identified transcripts (approximately 48% of transportome). Regarding the number of differentially expressed unigenes (DEGs) in Jc171 and Jc183, it was found 116 and 01, respectively ( $p\text{-value} \leq 0.0001$ ,  $FDR \leq 0.005$ ,  $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$  or  $\leq -1$ ). The non-modulation of the MTP in the Jc183 accession may be attributed to its genotype tolerance to higher concentrations of NaCl. The transcriptional modulation was notorious to the Jc171 accession (sensitive), due the induction of the families: MFS (08), sulfate transporters, MC (08) and F-ATPase (08) and MIP (Major Intrinsic Protein - 22). The F-ATPases act in vacuolar  $\text{Na}^+$  sequestration and oxidative stress minimization, while mitochondrial carriers (MC family) minimize the mitochondrial ROS and oxidative stress. In turn, sugar transporters (MFS family) reinforce osmotic adjustment, monosaccharides reabsorption, and keep membrane stability, while aquaporins (MIP family) contribute to ROS detoxification, pointing proline and antioxidant enzymes. The MIP family, called aquaporins (AQPs), showed the highest number of induced unigenes, which corresponded to the subfamilies: PIP (Plasma Membrane Intrinsic Proteins - 15), TIP (Tonoplast Intrinsic Proteins - 6) and SIP (Small Basic Intrinsic Proteins - 1). The differential regulation of these transporters contributes to the osmotic adjustment, reduction of oxidative stress and ionic toxicity; and maintaining water balance under saline conditions. Therefore, our work demonstrates the role of MTP genes in the adaptive response of physic nut to salinity.

**Keywords:** Abiotic stress; *Jatropha curcas*; RNA-Seq.

## LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1 - Características morfológicas de *J. curcas*. A - Inflorescências, flor feminina e flor masculina; B - Fruto e folha; C – Fruto seccionado e semente..... 18
- Figura 2 - Efeitos da salinidade em plantas..... 21
- Figura 3 - Mecanismos celulares de tolerância das plantas à salinidade..... 22
- Figura 4 - Mecanismos celulares de tolerância ao sal envolvendo PTM em célula de raiz – compartimentalização de Na<sup>+</sup> no vacúolo e homeostase iônica..... 25
- Figura 5 - Fluxograma das etapas de um experimento típico de RNA-Seq..... 30
- Figura 6 - Estratégias de montagem de transcriptoma obtido via RNA-Seq..... 32

### ARTIGO I

- Figura 1 - Famílias de proteínas de transporte de membrana (MTP) com unigenes diferencialmente expressos (DEGs) de *J. curcas* após 3h de exposição ao sal (150 mM NaCl). DEGs induzidos (UR) e reprimidos (DR) são representados, respectivamente, por barras vermelhas e azuis. DEGs: valor  $p \leq 0,0001$ ,  $FDR \leq 0,005$ ,  $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$  (UR) ou  $\leq -1$  (DR)..... 40
- Figura 2 - Heatmaps baseados na modulação da expressão gênica de membros das famílias PTM (Proteínas de transporte de membranas) identificados em raízes de *Jatropha curcas* (Jc171) após exposição de 3h a NaCl (150 mM), em relação ao controle negativo sem sal (valores  $\text{Log}_2\text{FC}$ ). A indução e repressão dos genes diferencialmente expressos são indicados em vermelho e azul, respectivamente, e a intensidade das cores está de acordo com a legenda. Os asteriscos (\*) identificam DEGs selecionados para a análise RT-qPCR..... 41

Figura 3 - Diagrama de Venn comparando os fatores de transcrição enriquecidos ( $p$ -valor  $\leq 0,01$ ) identificados (ferramenta PlantRegMap) para cada grupo de candidatos PTM (Proteínas de Transporte de Membrana): induzidos (UR), reprimidos (DR) ou não DEGs [Gens Diferencialmente expressos:  $p$ -value  $\leq 0,0001$ , FDR  $\leq 0,005$ , Log2FC  $\geq 1$  (UR) ou  $\leq -1$  (DR)]...... 43

## ARTIGO II

Figura 1 - Análise filogenética de Aquaporinas de *A. thaliana* (At), *J. curcas* (Jc) e *M. esculenta* (Me). As sequências proteicas foram alinhadas no MAFFT e a árvore foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança (10000 repetições de bootstrap) no IQTREE..... 65

Figura 2 - Motivos conservados das 24 JcAQPs indentificadas no transcriptoma *J. curcas* exposto sob salinidade (150 mM NaCl). A - Os motivos estão numerados são exibidos em diferentes cores. B - Sequência consenso de cada motivo (1-10) identificado..... 66

Figura 3 - Estrutura exon-ínton das 24 JcAQP indentificadas no transcriptoma *J. curcas* exposto sob salinidade (150 mM NaCl) via software GSDS. Bloco azul – regiões 5' e 3'UTR; bloco amarelo – exon; linha preta – ínton..... 67

Figura 4 - Heatmap mostrando o perfil de expressão dos transcritos codificadores de JcAQPs induzidos (DE;  $p$ -value  $\leq 0,0001$ , FDR  $\leq 0,005$ , Log2 FC  $\geq 1$  or  $\leq -1$ ) em Jc171 após tratamento salino (150 mM NaCl). (a) transcritos completos, (b) transcritos incompletos. Os unigenes induzidos são indicados em vermelho e a intensidade da cor está de acordo com a legenda (Log2FC). \*Alvos selecionados para o ensaio de RT-qPCR..... 72

## LISTA DE TABELAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 - Regulação da expressão gênica de PTM em plantas submetidas ao estresse salino.....	28
---	----

### ARTIGO I

Tabela 1 - Expressão gênica relativa e parâmetros de RT-qPCR [eficiência de amplificação (E), declive (S), coeficiente de correlação (R) e interceptação Y] derivados de transcritos codificadores de proteínas de transporte de membrana de <i>Jatropha curcas</i> L. expressos em raízes após 3 h de exposição salina (150 mM NaCl).....	42
--	----

### ARTIGO II

Tabela 1 - Caracterização das Aquaporinas identificadas no transcriptoma de <i>J. curcas</i> expresso sob salinidade (150mM NaCl).....	64
--	----

Tabela 2 - Motivos NPA, filtros ar/R e Posições de Froger em JcAQPS expressas em raízes sob salinidade (150mM).....	69
---	----

Tabela 3 - Resumo das típicas SDPs identificadas em JcAQPs expressas em raízes de <i>J. curcas</i> sob salinidade (150mM).....	70
--	----

Tabela 4 - Expressão gênica relativa e parâmetros RT-qPCR [eficiência de amplificação (E), declive (S), coeficiente de correlação (R) e interceptação Y] derivados de JcAQPs expressas em transcriptoma de raízes de <i>J. curcas</i> submetidas a exposição salina (3h, NaCl 150 mM).....	73
--	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
3.1 <i>Jatropha curcas</i> L – aspectos gerais e importância econômica .....	17
3.2 Efeitos da salinidade em plantas .....	20
3.3 Proteínas de transporte de membrana (PTM) na resposta adaptativa à salinidade .....	24
3.4 Transcriptômica.....	29
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
4.1 ARTIGO 1.....	34
Análise do transcriptoma de <i>Jatropha curcas</i> submetida à salinidade (150 mM NaCl) .....	34
4.2 ARTIGO 2.....	57
Identificação e Caracterização de Aquaporinas em transcriptoma de <i>Jatropha curcas</i> submetida à exposição salina (150 mM NaCl) .....	57
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	86
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87

## 1 INTRODUÇÃO

O pinhão manso (*Jatropha curcas*) é uma espécie pertencente à família Euphorbiaceae com grande potencial para a produção de biodiesel devido ao elevado teor de óleo nas suas sementes (40-50%) (WANG et al., 2018; WU; ZHANG, 2020). Essa espécie é considerada tolerante à seca e consegue desenvolver-se bem em solos de baixa fertilidade, tornando-a uma boa opção para o cultivo em regiões áridas (MAES et al., 2009). Entretanto, a salinidade é uma condição comum nessas regiões que afeta a produtividade do pinhão manso (SILVA et al., 2013; REAL et al., 2019).

A salinidade é um dos principais estresses ambientais que afeta o crescimento e desenvolvimento das plantas, causando sérios prejuízos para a agricultura (SAFDAR et al., 2019). A raiz é o primeiro órgão que sofre os impactos desse estresse, onde o aumento principalmente dos íons de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ) provoca inicialmente o estresse osmótico, seguido do desequilíbrio iônico e estresse oxidativo (DINNENY, 2019).

Sob condições salinas, as plantas ativam várias vias moleculares envolvendo a percepção, sinalização e a regulação de genes responsivos ao estresse. Algumas estratégias associadas à tolerância a salinidade em muitas plantas incluem: restrição do influxo e efluxo de  $\text{Na}^+$ , compartimentação dos íons tóxicos nos vacúolos, retenção do potássio ( $\text{K}^+$ ) e manutenção do potencial osmótico (ISAYENKOV; MAATHUIS, 2019; BERNSTEIN, 2019).

Estes processos ocorrem predominantemente em ambiente radicular e a tolerância ao referido estresse é amplamente dependente de proteínas de transporte de membrana (PTM), que incluem diversas famílias multigênicas de transportadores, canais iônicos e bombas de transporte (MANSOUR, 2014).

Algumas das principais PTM que atuam revertendo a toxicidade causada pelos níveis elevados de  $\text{Na}^+$  incluem: SOS1, intimamente associado à exclusão de  $\text{Na}^+$  pela membrana plasmática; e transportador antiporte NHX, V-ATPase, V-PPase, responsáveis pela compartimentação do  $\text{Na}^+$  nos vacúolos (NIKALJE et al., 2018). A absorção de  $\text{Na}^+$  pelas raízes leva ao efluxo do  $\text{K}^+$  que prejudica o metabolismo celular. Portanto, a retenção de  $\text{K}^+$  por PTM (AKT1, KUP/HAK/KT, KIR) representam outro mecanismo associado a tolerância à salinidade (YOUSEFIRAD et al., 2020).

As relações hídricas durante o estresse salino é um ponto crítico na resposta de tolerância das plantas. A família aquaporina (AQP) inclui proteínas transmembranares (PIP, TIP, NIP, SIP e XIP) que facilitam o transporte de água e outros solutos através das células e compartimentos intracelulares (SINGH et al., 2020). A regulação diferencial das AQPs assim como a superexpressão de alguns representantes dessa família conferem tolerância à salinidade em muitas plantas cultivadas (SUN et al., 2017; LI et al., 2019).

Informações a respeito das famílias gênicas codificadores de PTM na resposta à salinidade em pinhão manso são escassas (ZHANG et al., 2014). Portanto, analisamos a regulação a nível molecular (RNA-Seq) desses transportadores em raízes de *J. curcas* sob NaCl (150 mM). O transportoma aqui identificado e analisado contribuiu para decifrar a resposta inicial do pinhão-manso ao NaCl, o que apresentam potencial para acentuar a tolerância a sais em plantas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Analisar a modulação da expressão de transcritos codificadores de proteínas de transporte de membrana (PTM) em acessos tolerante e sensível de pinhão manso sob salinidade.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Anotar os transcritos codificadores de PTM oriundos do transcriptoma RNA-Seq de acessos contrastantes de pinhão manso em resposta ao estresse salino (150 mM NaCl; 3 horas).
- Analisar a expressão diferencial dos transcritos PTM para cada acesso, visando identificar potenciais genes estresse-responsivos associados ao processo de tolerância.
- Executar análises estruturais e filogenética da família gênica de PTM com modulação expressiva em resposta ao sal.
- Validar a expressão de alvos relacionados à resposta de tolerância ao sal via RT-qPCR.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 *Jatropha curcas* L – aspectos gerais e importância econômica

*J. curcas*, conhecida popularmente como pinhão manso ou simplesmente jatropa, pertence à família Euphorbiaceae (CONTRAN et al., 2013). Essa espécie tem como mais provável centro de origem e domesticação a região Mesoamericana, mais especificamente o estado de Chiapas no México e a Guatemala, e a região costeira ao longo do Golfo do México, respectivamente (PECINA-QUINTERO et al., 2014; ANAYA et al., 2016). Embora nativa da América do Norte e Central, *J. curcas* está dispersa nas áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo, como África, Índia, Sudeste Asiático e China (KAMEL et al., 2018).

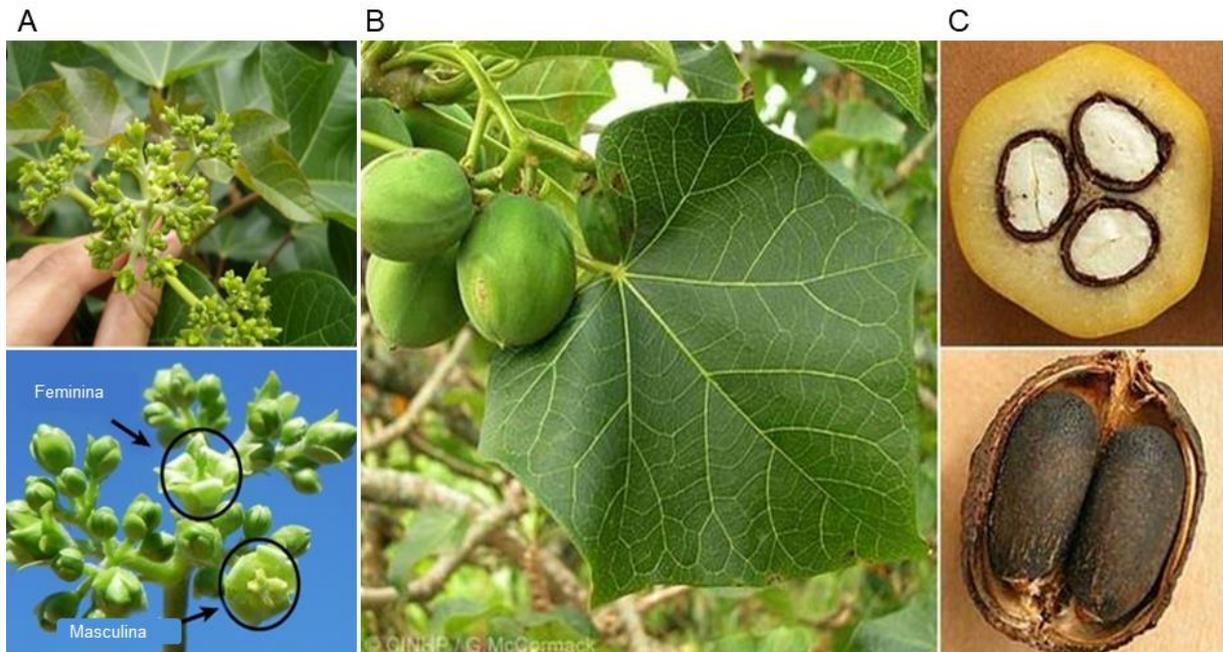
O gênero *Jatropha* engloba cerca de 175 espécies típicas de climas tropicais e quentes, das quais *J. curcas* é uma das mais conhecidas e economicamente importante (CAVALCANTE; SANTOS; ALMEIDA, 2020). O pinhão manso é uma espécie diploide, com  $2n = 22$  cromossomos e genoma com tamanho aproximado de 339 milhões de pares de bases (DAHMER; WITTMANN; DIAS, 2009; HA et al., 2019).

Em relação à morfologia, *J. curcas* é um arbusto de tamanho médio entre 3-5 metros de altura, com folhas verdes, largas, geralmente simples, angulares e filotaxia espiral (Figura 1B) (ALMEIDA et al., 2019). Tal espécie monoica possui inflorescências terminais (Figura 1A), com comprimento de pecíolo entre 6 e 23 mm, e caule com madeira maciça e casca cinza lisa que se danificada exsuda um látex aquoso e esbranquiçado (ANAYA et al., 2016; ALMEIDA et al., 2019). Os frutos têm formato oval, são secos, deiscentes, coriáceos e triloculares abrigando uma semente em cada cavidade (Figura 1C) (VIRGENS et al., 2017).

*J. curcas* é uma espécie não alimentícia com alto rendimento dos grãos (5 t ha<sup>-1</sup>) e grande potencial para a produção de biocombustíveis, devido ao elevado teor de óleo de suas sementes (40-50%) (WANG et al., 2018). O seu óleo é composto principalmente pelos ácidos linoleico, esteárico, oleico, palmítico e araquídico que podem ser convertidos em seus ésteres metílicos durante a reação de transesterificação, formando o biodiesel (CARDOSO et al., 2018; KAMEL et al., 2018). Além disso, o óleo de *J. curcas* possui outras características adequadas para a produção de biocombustível como: baixa acidez, boa estabilidade à oxidação em comparação ao óleo de soja, menor viscosidade do que o óleo de mamona e

melhores propriedades no frio em comparação ao óleo de palma (GONZÁLES, 2016). Desta forma, *J. curcas* destaca-se como uma planta para a produção de bioenergia sustentável, que implica na redução do dióxido de carbono na atmosfera (MONTES; MELCHINGER, 2016).

Figura 1. Características morfológicas de *J. curcas*. A - Inflorescências, flor feminina e flor masculina; B - Fruto e folha; C – Fruto seccionado e semente.



Fonte: Adaptado de Montes; Melchinger (2016) e Heller (1996).

A produção do óleo de *J. curcas* está concentrada nos países asiáticos, sendo os principais produtores a China e a Índia. A produção anual de 32.212.600 t óleo de pinhão manso, considerando os dez maiores produtores mundiais, geram 26.045.344 t de biodiesel (PILOTO-RODRÍGUEZ et al., 2020). No Brasil, a produção em larga escala ainda é uma promessa, pois é considerada uma espécie em domesticação e não existem cultivares geneticamente melhoradas (LAVIOLA et al., 2019; CARNEIRO et al., 2021).

O pinhão manso apresenta crescimento rápido e sistema de propagação simples, que se destaca por apresentar alta adaptabilidade a uma variedade de condições climáticas e edáficas, como por exemplo desenvolve-se em solos de baixa fertilidade (MAZUMDAR et al., 2018; RAMOS et al., 2018). Tais características possibilita o cultivo dessa espécie em terrenos inadequados para o plantio e, dessa forma, não compete com o cultivo de plantas destinadas à alimentação humana (HERRERA et al., 2019; HA et al., 2019). Um estudo recente na Indonésia avaliou características relacionadas à produção de sementes durante cinco anos e mostrou

que alguns genótipos de *J. curcas* (JCUMM5, JCUMM7 e JCUMM18) são promissores para o cultivo em áreas secas (ZAINUDIN et al., 2020). Além disso, a cultura do pinhão manso pode prevenir e controlar a erosão do solo, bem como recuperar áreas degradadas, o que permitiu a expansão do seu cultivo, principalmente, em regiões inadequadas para espécies sensíveis à seca (ALMEIDA et al., 2019). Todas essas particularidades tornam o pinhão manso uma das espécies mais promissoras para a produção de biodiesel em regiões tropicais.

O subproduto da extração do óleo de pinhão manso, conhecido como torta de sementes (seed cake), geralmente é tóxico devido à alta concentração da proteína curcina e ésteres de forbol, o que inviabiliza o aproveitamento para alimentação animal. Mas esse subproduto tem se mostrado um bom adubo orgânico por possuir alto teor de nitrogênio, e dessa forma pode substituir fertilizantes químicos (BEKALU; FEKAD, 2020). A torta de sementes de *J. curcas* é um fertilizante orgânico que supera o estrume de vaca, atuando tanto na construção da estrutura como na redução da perda da umidade do solo (MARZOUK, 2020).

Embora não seja uma planta alimentícia devido geralmente possuir compostos tóxicos, é importante destacar que no México existem algumas variedades de pinhão manso não tóxicas, livres de ésteres de forbol. A pasta residual de *J. curcas* contém um alto teor proteico (23-26%) e se obtida das variedades não tóxicas tem potencial para utilização na alimentação animal e humana (HERRERA et al., 2019).

*J. curcas* também apresenta propriedades medicinais. Extratos dessa planta ricos em alcaloides têm a capacidade de inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas (RAMPADARATH; PUCHOOA; JEEWON, 2016). Além disso, um composto extraído da semente de pinhão manso, o isoamericanol, têm efeito inibitório na proliferação de células cancerígenas humanas (KATAGI et al., 2016).

O látex extraído de *J. curcas* apresenta metabólitos e compostos bioativos com potencial para aplicações medicinais. Evidências científicas reportam atividade anticoagulante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiproliferativa e cicatrizante do látex de *J. curcas* e confirmam as aplicações dessa planta na medicina tradicional (ALMEIDA et al., 2019). Dessa forma, a espécie apresenta-se também como um grande recurso para fins terapêuticos.

Portanto, o seu cultivo e utilização como um todo apresenta um grande potencial econômico e social (por exemplo, geração de emprego) e sustentabilidade

favorecendo o meio ambiente (recuperação de terras degradadas e geração de combustíveis menos poluentes) (GONZÁLES, 2016).

Do ponto de vista do melhoramento genético, é importante destacar que *J. curcas* possui mecanismos que garantem eficiência no uso de água sob condições de estresse hídrico, além de apresentar boa recuperação após reidratação (SAPETA et al., 2013). Os principais mecanismos envolvidos nesses dois processos são uma regulação estomática muito eficiente, que evita perda de água, e a dissipação do excesso de luz que protege o aparelho fotoquímico (SAPETA et al., 2016). Isso reforça a ideia de que *J. curcas* é adequada para cultivo em regiões com pouca disponibilidade de água.

Embora seja uma espécie apropriada para cultivo em regiões áridas *J. curcas* é sensível à salinidade, uma condição comum nessas regiões que afeta drasticamente a produtividade das culturas (SOUZA et al., 2020). Portanto, estudos sobre a resposta de *J. curcas* submetidas a condições de estresse salino são cruciais para o melhoramento dessa espécie.

### **3.2 Efeitos da salinidade em plantas**

A salinidade é um dos maiores problemas enfrentado pela agricultura, especialmente em regiões áridas e semiáridas de todo o mundo. A maioria das espécies de interesse econômico são glicófitas, que em condições acima de 40 mM NaCl apresentam redução no crescimento e comprometimento fisiológico, podendo levar à morte (ABOBATTA, 2020).

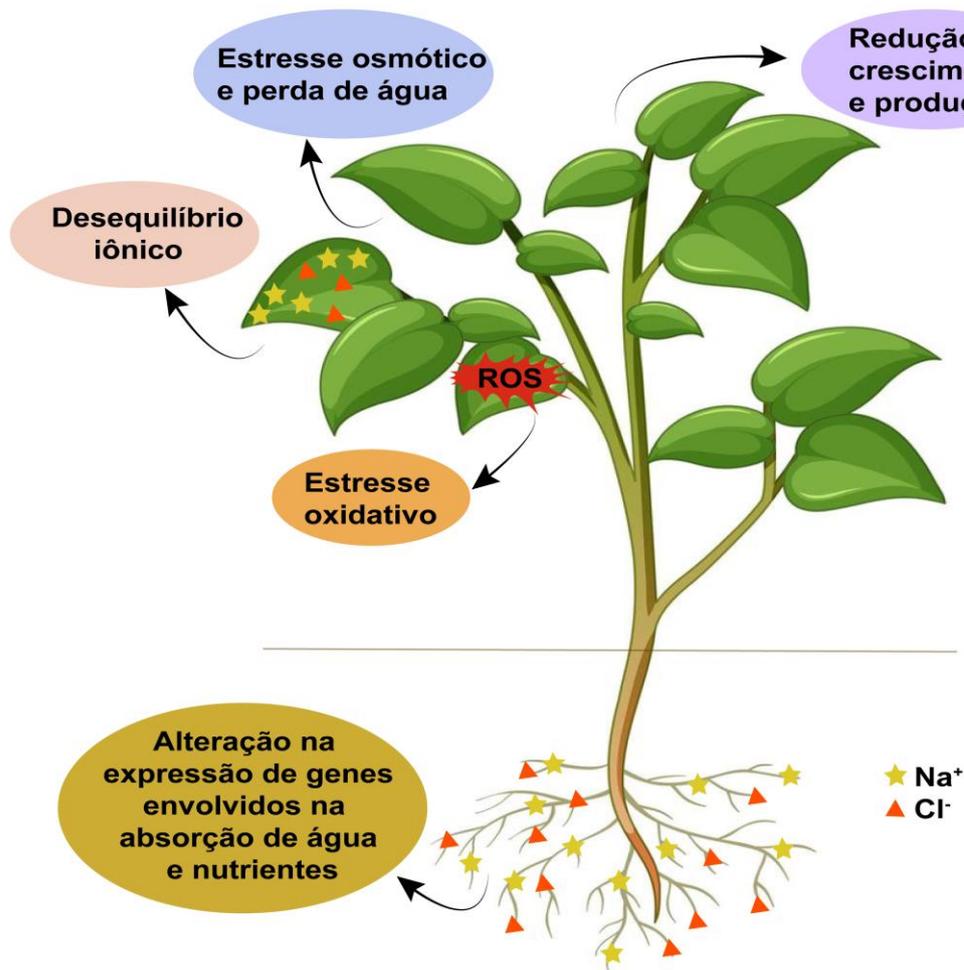
Além dos solos naturalmente salinos, práticas de irrigação com água contaminada por cloreto de sódio (NaCl) e mudanças climáticas são fatores que propiciam o aumento da salinização dos solos (ZELM, ZHANG, TESTERINK, 2020). Há estimativas de que até 2050 metade das terras aráveis em todo o mundo serão afetadas pela salinidade (BUTCHER et al., 2016). Dessa forma, compreender os mecanismos empregados pelas plantas na resposta à salinidade é um passo indispensável para o desenvolvimento da agricultura moderna (ZHAO et al., 2020).

A resposta das plantas à salinidade é bastante complexa, mas normalmente há duas fases, o estresse osmótico e a toxicidade iônica no primeiro e segundo estágios, respectivamente (Figura 2) (BUTCHER et al., 2016). No estágio inicial, o sistema radicular percebe o estresse salino que leva à redução da disponibilidade de água, induzindo o estresse osmótico. Em seguida, ocorre a toxicidade iônica

associada à absorção excessiva dos íons de cloro ( $\text{Cl}^-$ ) e sódio ( $\text{Na}^+$ ) que provocam desequilíbrio de nutrientes no citosol, como a deficiência de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ). Isso afeta o crescimento vegetal tanto no estágio inicial como tardio uma vez que o excesso dos íons de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  prejudicam os processos metabólicos e reduzem a eficiência fotossintética (ACOSTA-MOTOS et al., 2017; DEINLEIN et al., 2014).

A salinização dos solos provoca ainda o estresse oxidativo, devido à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) que causa danos severos às organelas celulares das plantas (Figura 2) (SHAHZAD et al., 2019). Além disso, os níveis elevados de ROS provocam um grande distúrbio iônico nas plantas, afetando o metabolismo celular (Figura 2) (TANVEER; AHMED, 2020).

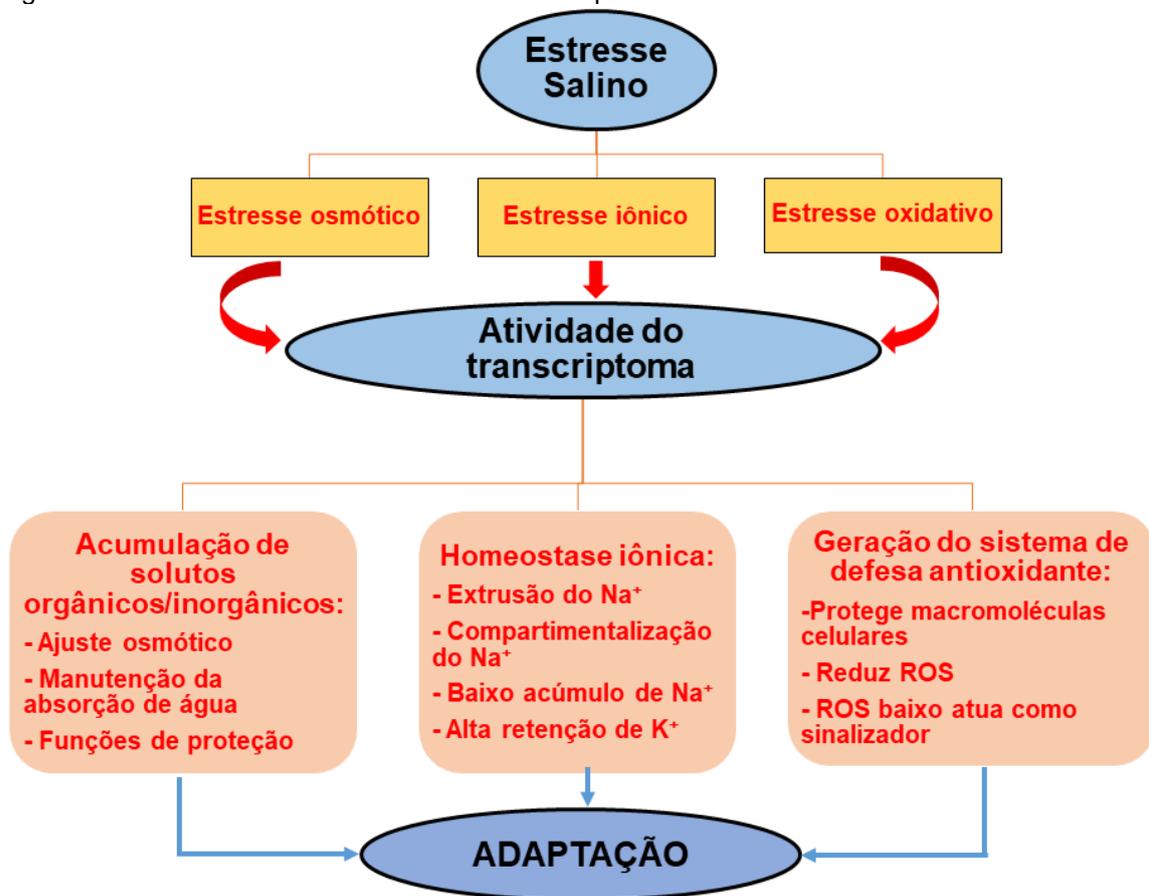
Figura 2. Efeitos da salinidade em plantas.



Fonte: A autora (2021).

As plantas desenvolveram uma série de estratégias que envolvem alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares para se aclimatar ao estresse salino (HERNÁNDEZ, 2019). Após a percepção do estresse, moléculas sinalizadoras podem desencadear uma reação em cascata que ativa proteínas de defesa celular e fatores de transcrição que regulam genes responsivos ao estresse, o que leva gradualmente à adaptação (LIANG et al., 2018). Os mecanismos celulares de tolerância das plantas relacionados ao estresse osmótico, iônico e oxidativo induzidos pela salinidade estão resumidos na figura 3.

Figura 3. Mecanismos celulares de tolerância das plantas à salinidade.



Fonte: Adaptado de Mansour; Salama (2019).

A mitigação do estresse osmótico envolve mecanismos que reduzem a perda e maximizam a absorção de água. Além disso, a efluxo dos íons de Na<sup>+</sup> das folhas e a sua compartimentalização, principalmente nos vacúolos, são estratégias empregadas pelas plantas para aliviar o estresse iônico (DEINLEIN et al., 2014). Simultaneamente ao processo de extrusão do Na<sup>+</sup> do citoplasma, a célula vegetal acumula solutos compatíveis ou osmólitos, que são essenciais para equilibrar a

pressão osmótica nos vacúolos (HANIN et al., 2016). Os principais osmólitos sintetizados pelas plantas incluem a prolina, açúcares solúveis, glicina e betaína, essenciais para o ajuste osmótico que por sua vez, é um processo crítico para manutenção da turgescência celular e do metabolismo das plantas (LIANG et al., 2018).

Os solutos compatíveis desempenham ainda função de proteção, uma vez que têm a capacidade de se ligarem a macromoléculas celulares, evitando sua desnaturação. Além disso, os solutos compatíveis mitigam os danos do estresse oxidativo aos transportadores de membrana, pois reduzem a formação de ROS e/ou na proteção direta desses transportadores (MANSOUR; SALAMA, 2019).

As proteínas localizadas nas membranas celulares (plasmática, tonoplasto, etc), incluindo os canais iônicos e transportadores desempenham papel chave na resposta ao estresse iônico provocado pela salinidade, pois garantem a passagem seletiva de íons específicos que leva, posteriormente, à homeostase iônica (MANSOUR, 2014). Esses transportadores são responsáveis principalmente por eliminar o excesso  $\text{Na}^+$ , que é tóxico para célula, e reter o potássio para a manutenção do equilíbrio da taxa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , vital para o metabolismo celular vegetal (HAN et al., 2018).

O aumento dos íons de  $\text{NaCl}$  nas raízes de plantas sob condições salinas é acompanhado por elevados níveis de ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{O}_2$ ) (ZELM; ZHANG; TESTERINK, 2020), que oxidam proteínas e comprometem a integridade das macromoléculas, podendo levar à morte celular (AHMAD et al., 2019).

As plantas desenvolveram métodos de defesa enzimático e não enzimáticos para conter os prejuízos causados pelo estresse oxidativo (ACOSTA-MOTOS et al., 2017). A desintoxicação de ROS de forma enzimática envolve a regulação positiva de enzimas antioxidantes, como: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutatona peroxidase (GPX) (HANIN et al., 2016). Já nos mecanismos não enzimáticos de eliminar ROS atuam metabólitos antioxidantes, como o ácido ascórbico (ASH), glutatona (GSH), compostos fenólicos, alcalóides, aminoácidos não proteicos, alfa-tocoferol e carotenoides (MUCHATE et al., 2016).

Embora altos níveis de ROS sejam danosos para as células vegetais, baixos níveis de ROS atuam como moléculas sinalizadoras que regulam o metabolismo, funções celulares e várias redes genéticas responsivas ao estresse (KUMAR et al., 2017).

Portanto, a homeostase durante o estresse salino envolve o ajuste osmótico, o equilíbrio iônico e a defesa antioxidante. Proteínas integrais de membrana envolvidas no transporte de íons e outras macromoléculas desempenham papel crucial na resposta adaptativa das plantas à salinidade e representam alvos de interesse da engenharia genética para obtenção de culturas tolerantes ao estresse salino (MANSOUR, 2014).

### **3.3 Proteínas de transporte de membrana (PTM) na resposta adaptativa à salinidade**

Proteínas de transporte de membrana (PTM) são proteínas transmembranares envolvidas no movimento de íons, pequenas moléculas e macromoléculas através das membranas biológicas e correspondem a diversas famílias multigênicas de transportadores, canais iônicos e bombas de transporte (MANSOUR, 2014). As PTM são bastante diversas na estrutura molecular, apresentando variação no número de domínios transmembranares assim como nos filtros de seletividade para permitir a passagem de íons específicos (VOLKOV; BEILBY, 2017).

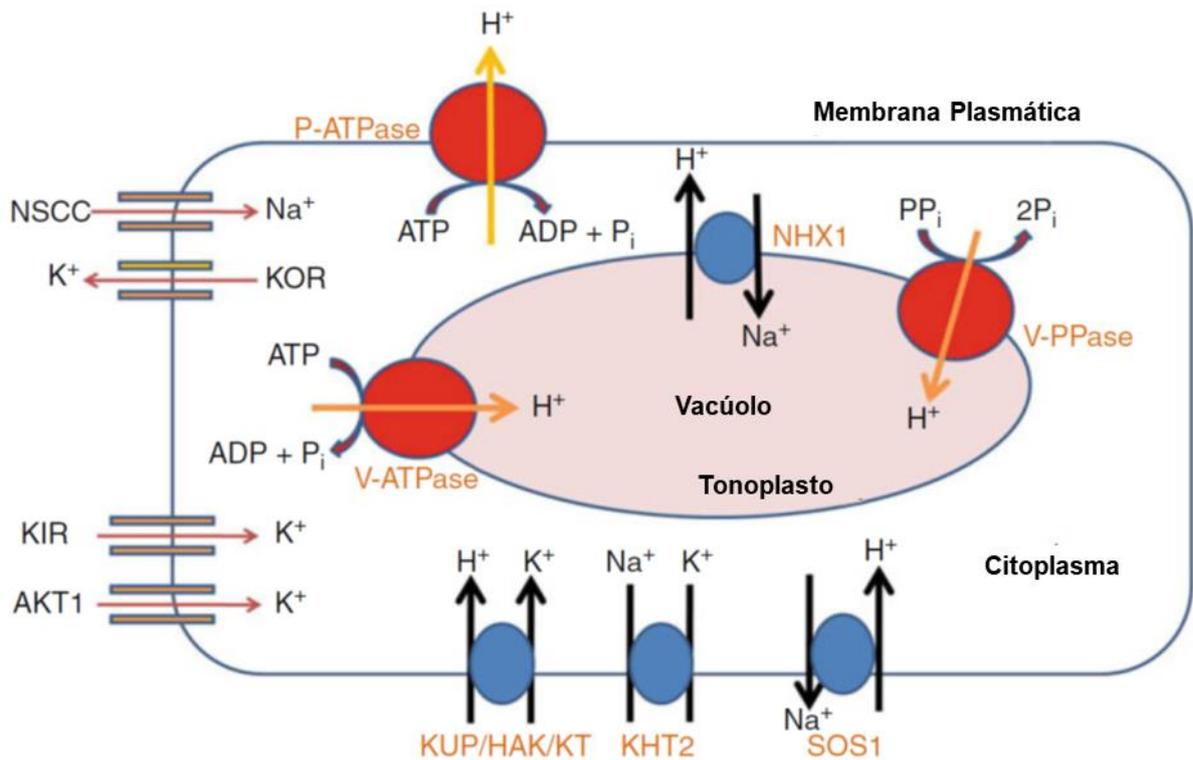
O transporte de íons é peça fundamental para a tolerância à salinidade nas plantas uma vez que inclui o transporte de cátions e ânions através da membrana plasmática das células da raiz, a eliminação de  $\text{Na}^+$  para o meio extracelular assim como a compartimentalização de  $\text{Na}^+$  nos vacúolos (VOLKOV; BEILBY, 2017). Todo esse sistema de transporte visa garantir a homeostase iônica, que basicamente constitui-se no acúmulo de íons essenciais ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) para a nutrição vegetal e na redução dos íons tóxicos (principalmente  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) (Figura 4) (HAN et al., 2018).

Vários transportadores estão envolvidos na captação e movimentação do  $\text{Na}^+$  através da membrana plasmática. A penetração de  $\text{Na}^+$  na interface solo/raiz ocorre por meio de canais de cátion não seletivos NSCCs (non-selective cation channels) ao mesmo tempo que o efluxo de  $\text{K}^+$  ocorre pelos canais KOR (outward-rectifying  $\text{K}^+$  channels) (MANSOUR, 2014). Outros grupos de transportadores atuam para controlar esse desequilíbrio na taxa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  causado pela salinidade que é prejudicial para o metabolismo vegetal.

Os íons  $\text{Na}^+$  são expulsos das células por meio dos transportadores SOS1 (Salt-Overly-Sensitive), enquanto o influxo de  $\text{K}^+$  é regulado por AKT1 ( $\text{K}^+$  in channels), KUP/HAK/KT (high affinity  $\text{K}^+/\text{H}^+$  symporters) e KIR (inward-rectifying  $\text{K}^+$

channels) na membrana plasmática (SHABALA; MACKAY, 2011). Transportadores antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  são codificados pelo SOS1 e encontrados em muitos genomas de plantas sendo indispensáveis na manutenção da homeostase iônica, o que garante a sobrevivência e crescimento sob condições salinas. Esses transportadores usam o gradiente de prótons estabelecido pela  $\text{H}^+$ -ATPase (P-ATPase) para trocar  $\text{Na}^+$  por  $\text{H}^+$  através da membrana plasmática (ZELM; ZHANG; TESTERINK, 2020). A compartimentalização de  $\text{Na}^+$  nos vacúolos depende do antiporte vacuolar NHX1 ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger) e das V-ATPase e V-PPase que são essenciais para estabelecer o gradiente de prótons no tonoplasto (LIANG et al., 2018; HE et al., 2014).

Figura 4. Mecanismos celulares de tolerância ao sal envolvendo PTM em célula de raiz – compartimentalização de  $\text{Na}^+$  no vacúolo e homeostase iônica.



Fonte: Adapado de Mansour; Salama (2019).

A retenção de  $\text{K}^+$  na raiz é outra característica associada à tolerância à salinidade em plantas (LIU et al., 2019). A retenção de  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  nas células da raiz realizada por transportadores com afinidade pelo  $\text{K}^+$  também colaboram para o processo de desintoxicação do  $\text{Na}^+$  que por sua vez aumenta a tolerância da planta ao estresse osmótico e oxidativo (HAN et al., 2018).

Essas estratégias da regulação da absorção e exclusão de  $\text{Na}^+$  da célula, assim como a captação de  $\text{K}^+$  são comumente usadas pelas plantas para manter as razões citosólicas desejáveis de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , o que garante o ajuste osmótico (MUCHATE et al., 2016).

Outro grupo de PTM com destaque na tolerância à salinidade em plantas inclui as aquaporinas (AQPs). As AQPs são bastante diversas em plantas e de acordo com análises filogenéticas e a localização subcelular são classificadas em cinco subfamílias: PIPs (*plasma membrane intrinsic proteins*), TIPs (*tonoplast intrinsic proteins*), NIPs (*nodulin 26-like proteins*), SIPs (*small basic intrinsic proteins*) e XIPs (*uncharacterized intrinsic proteins*) (FOX; MAISTRIAUX; CHAUMONT; 2017).

As AQPs facilitam a permeabilidade das membranas à água e a outras moléculas pequenas, como uréia,  $\text{CO}_2$ , glicerol, silício, boro e peróxido de hidrogênio (SINGH et al., 2020). Uma vez que o déficit hídrico é desencadeado pela salinidade, o papel das aquaporinas é aumentar a absorção de água pelas raízes, o que contribui para a manutenção do turgor e homeostase osmótica (MANSOUR; SALAMA, 2019).

A família das AQPs é altamente regulada sob condições de estresse salino, de modo que pode ocorrer tanto a indução como a repressão desses genes nas raízes. Destacam-se as PIPs que estão associadas à regulação da condutividade hidráulica da raiz pela planta sob salinidade, e TIPs que atuam principalmente no transporte de ROS citoplasmático, ureia, amônia e íons nitrato para o vacúolo junto com a água (MCGAUGHEY et al., 2018; SINGH et al., 2020).

Estudos anteriores revelam a expressão das PTM em plantas sob salinidade (Tabela 1). A retenção de  $\text{K}^+$  em células de raiz foi associada à indução dos transportadores AKT1 (48h; 100 Mm NaCl) em cultivar tolerante de arroz (*Oryza sativa*), e HKT1;5 (high-affinity potassium transporter - 6h) e HAK (3h e 6h) em cevada (*Hordeum vulgare*) em resposta ao sal (300 mM NaCl) (LIU et al., 2019; YOUSEFIRAD et al., 2020).

O aumento da expressão de HKT1;1 (2h; 150 Mm NaCl) de cevada (*Hordeum vulgare*) além de associado à retenção de  $\text{K}^+$ , atua indiretamente na redução do efluxo de  $\text{Ca}^+$  na raiz induzido pelo sal, o que reforça sua atuação na tolerância ao estresse salino (HAN et al., 2018). Por outro lado, níveis de transcritos de HKT2;1 em *Hordeum maritimum* foram mantidos constantes no ecótipo mais tolerante ao sal,

enquanto diminuíram no menos tolerante 48h após submetidas ao estresse (200 Mm NaCl) (HMIDI et al., 2019).

A análise do transcriptoma de canola (*Brassica napus*) revelou a indução de PTM envolvidas no transporte de potássio (HKT1;1; KOR1), na compartimentalização de Na<sup>+</sup> nos vacúolos (V-ATPase) e no ajuste osmótico (AQPs) em folhas de cultivar tolerante 24h após condições salinas (200 mM NaCl) (ULFAT et al., 2020).

A regulação das PTM também já foi demonstrada em plantas halófitas, o que corrobora a atuação desses transportadores na tolerância à salinidade. A regulação de genes PTM em *Sesuvium portulacastrum* foi demonstrada tanto nas raízes como nas folhas, de modo que o controle dos níveis de Na<sup>+</sup> foi associado à indução dos genes NHX, SOS1 e V-ATPase após 24h sob alta dose de salinidade (500 mM NaCl). Cabe destacar que a indução do gene SOS1 também ocorreu na raiz sob 150 mM NaCl (NIKALJE et al., 2018). Em outra halófito, *Halageton glomeratus*, também ocorreu a indução de transportadores P-H<sup>+</sup>-ATPase, V-H<sup>+</sup>-ATPase, V-Ppase (2h, 6h, 24h e 72h) SOS1 e AQP (72h) como mecanismo envolvido na homeostase iônica em raízes sob estresse salino (200 mM NaCl) (YAO et al., 2018).

Compreender a nível molecular a atuação e regulação dos genes PTM na resposta das plantas a salinidade apresenta enorme potencial para acentuar os mecanismos de tolerância a sais. Nesse sentido, estudos envolvendo a análise do transcriptoma são úteis aos programas de melhoramento de plantas, pois permitem identificar genes responsivos ao estresse.

Tabela 1. Regulação da expressão gênica de PTM em plantas submetidas ao estresse salino.

<b>Espécie</b>	<b>PTM</b>	<b>Tratamento (NaCl)</b>	<b>Tecido</b>	<b>Tempo</b>	<b>Técnica</b>	<b>Expressão</b>	<b>Referência</b>
<i>Oryza sativa</i>	AKT1	100 mM	Raiz	48h	RT-qPCR	UR	Liu et al., 2019
<i>Hordeum vulgare</i>	HKT1;1	150 mM	Raiz	2h	RT-qPCR	UR	Han et al., 2018
	HKT1;5 HAK	300 mM	Raiz	6h 3h, 6h	RNA-Seq	UR	Yousefirad et al., 2020
<i>Hordeum maritimum</i>	HKT2;1	200 mM	Raiz	48h	RT-qPCR	constante	Hmidi et al., 2019
<i>Sesuvium portulacastrum</i>	NHX	500 mM	Raiz e folha	24h	RT-qPCR	UR	Nikalje et al., 2018
	V-ATPase	500 mM	Raiz e folha				
	SOS1	150 e 500 mM	Raiz				
<i>Halogeton glomeratus</i>	SOS1	500 mM	Folha	2h, 6h, 24 e 72h	ISO-Seq	UR	Yao et al., 2018
	P-H+-ATPase	200 mM	Raiz				
	V-H+-ATPase						
	V-Ppase						
	SOS1						
AQP							

### 3.4 Transcriptômica

O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos expressos em uma célula em um estágio de desenvolvimento específico ou condição fisiológica (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Análises do transcriptoma são essenciais para interpretar os elementos funcionais do genoma e revelar os constituintes moleculares das células e tecidos, dessa forma, são vitais para entender a relação entre genótipo e fenótipo (ZHAO et al., 2019).

O principal foco de qualquer estudo transcriptômico é fornecer uma análise comparativa do perfil espacial e temporal dos genes expressos e da sua abundância entre amostras biológicas (ZHANG et al., 2014). De modo geral, os estudos de transcriptomas envolvem um estágio de desenvolvimento específico, uma parte do corpo de um organismo ou a resposta a um determinado tratamento (GENIZA; JAISWAL, 2017).

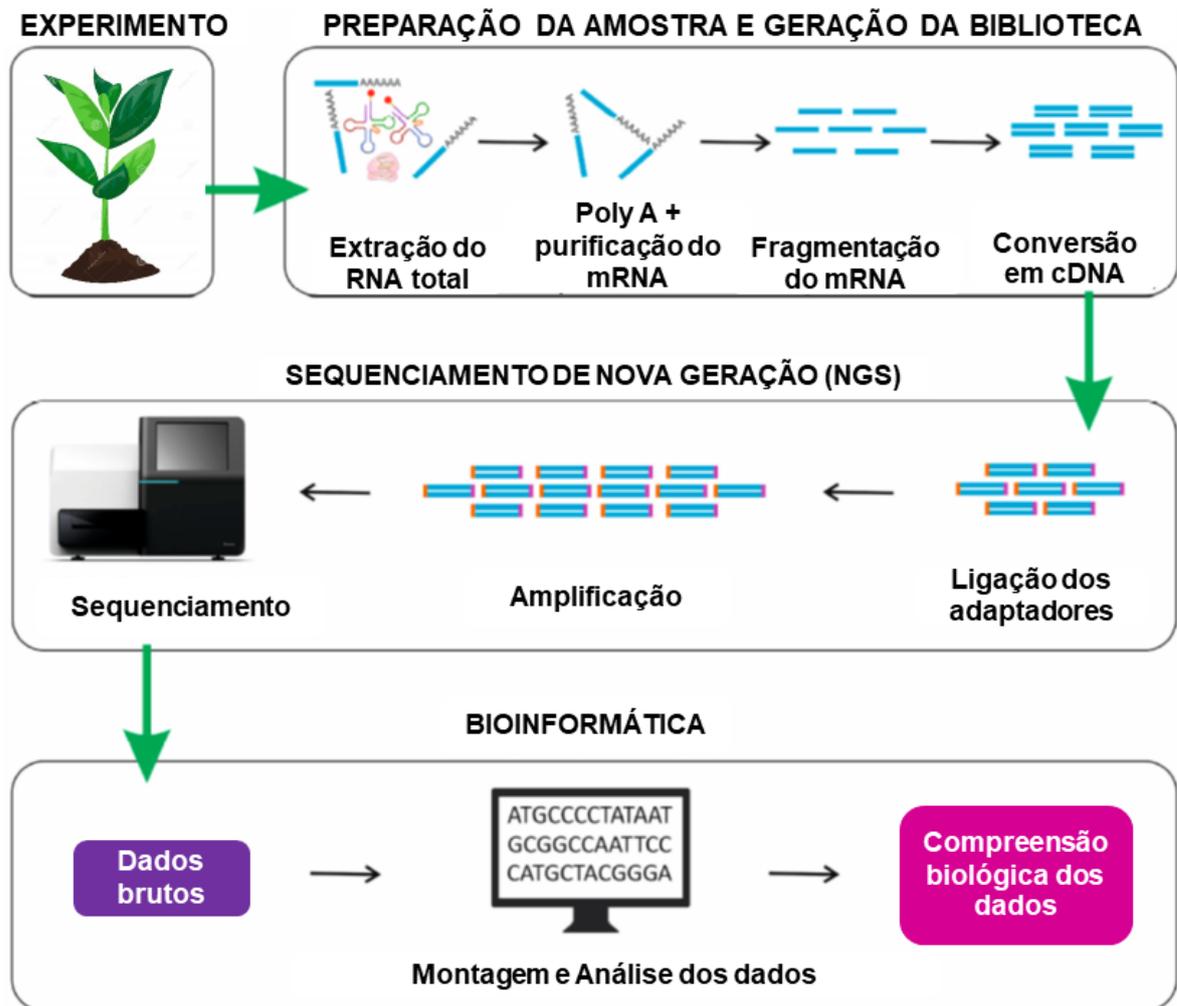
Existem várias tecnologias utilizadas para a obtenção do perfil de transcrição de um organismo, que permite além de quantificar a expressão gênica, identificar e isolar genes de interesse, bem como o desenvolvimento de marcadores funcionais e estudos genômicos comparativos (GARG; JAIN, 2013). Por exemplo, o sequenciamento de EST (expressed sequence tag), SAGE (serial analysis of gene expression), microarranjos de DNA e RNA-Seq (RNA Sequencing) (ZHAO et al., 2019). Geralmente o sequenciamento de EST é baseado na tecnologia de sequenciamento de Sanger, método de baixo rendimento e alto custo; o método SAGE gera sequências curtas (tags – 15/21 pb), normalmente uma parte destas não alinha de forma única no genoma, dificultando a identificação do transcrito completo; os microarranjos de DNA baseiam-se na hibridização e se restringem à análise de expressão apenas de sequências conhecidas (sondas) (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Essas desvantagens são fatores limitantes no desenvolvimento e aplicação destas técnicas (HRDLICKOVA TOLOUE; TIAN, 2017).

O RNA-Seq por sua vez é uma tecnologia moderna que utiliza o sequenciamento de próxima geração (NGS) ou o sequenciamento profundo (deep sequencing) para obter o perfil transcriptômico (SUDHAGAR; KUMAR; EL-MATBOULI, 2018). Tal metodologia revela diretamente a identidade da sequência e permite identificar genes desconhecidos e isoformas de transcritos, além de apresentar menos ruído e maior capacidade de detecção quando comparado com os Microarranjos de DNA (RAI et al., 2017). O RNA-Seq destaca-se por quantificar de

forma mais precisa a expressão diferencial dos transcritos, além de identificar transcritos de baixa abundância (MARTIN et al., 2013).

Um experimento típico de análise de transcriptoma via RNA-Seq envolve quatro etapas básicas: elaboração do experimento, preparação da amostra e geração das bibliotecas, sequenciamento e análise dos dados via ferramentas de bioinformática (Figura 5).

Figura 5. Fluxograma das etapas de um experimento típico de RNA-Seq.



Fonte: Adaptado de Sudhagar; Kumar; El-Matbouli (2018).

O desenho experimental do projeto deve considerar alguns fatores para garantir a obtenção de bons resultados, como: cobertura e profundidade do sequenciamento, número de réplicas biológicas e técnicas e escolha do tecido ou órgão bem como do tratamento a ser analisado (SUDHAGAR; KUMAR; EL-MATBOULI, 2018). É extremamente importante também conhecer as características relacionadas ao tamanho do genoma e nível de ploidia da espécie objeto de estudo

ou de espécies evolutivamente próximas, principalmente em estudos com plantas (GARG; JAIN, 2013).

A segunda etapa inicia-se com a extração do RNA total da amostra. É necessário um RNA de boa qualidade para dar prosseguimento ao experimento. As amostras de RNA geralmente são analisadas quanto ao número de integridade do RNA (RIN) que varia de 1 a 10, amostras com valores superiores a 6 são consideradas de boa qualidade (ROMERO et al., 2014).

O RNA total engloba as diferentes classes de RNA: rRNA (ribossômico), mRNA (mensageiro) e vários ncRNA (não codificantes). Na maioria das células eucarióticas o rRNA corresponde a 95% do RNA total, portanto a não eliminação desse tipo de RNA pode limitar a detecção dos tipos menos abundante (GARG; JAIN, 2013). O isolamento do subgrupo específico de RNA vai depender do objetivo da pesquisa e geralmente três métodos são empregados nesse passo: seleção pela Poly-A, depleção do rRNA e seleção por tamanho (HRDLICKOVA; TOLOUE; TIAN, 2017).

A seleção pela cauda Poly-A é um método bastante eficiente no enriquecimento de mRNA eucariótico, embora esse método resulte na perda dos ncRNAs e mRNAs que ainda não possuem cauda poly-A (MARTIN; WANG, 2011). A depleção de rRNA é mais apropriada quando os objetos de estudo incluem os longos ncRNAs e mRNA, já a seleção por tamanho quanto se pretende analisar apenas os pequenos ncRNAs (KUKURBA; MONTGOMERY, 2015).

Em seguida, tipicamente o RNA é fragmentado devido à limitação das plataformas de segunda geração sequenciarem fragmentos de até 600 pb, chamados de pequenos *reads* ("short-reads") (HRDLICKOVA; TOLOUE; TIAN, 2017). Plataformas mais recentes, terceira geração de sequenciadores, tem a capacidade de sequenciar fragmentos longos ("long-reads", >1000 bp), mas apresentam maior taxa de erro (STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019). Embora seja possível o sequenciamento direto de RNA, para a maioria dos estudos de expressão o RNA é convertido em DNA complementar (cDNA) (OZSOLAK; MILOS, 2011). Adaptadores são ligados nas extremidades do cDNA que então será amplificado e sequenciado.

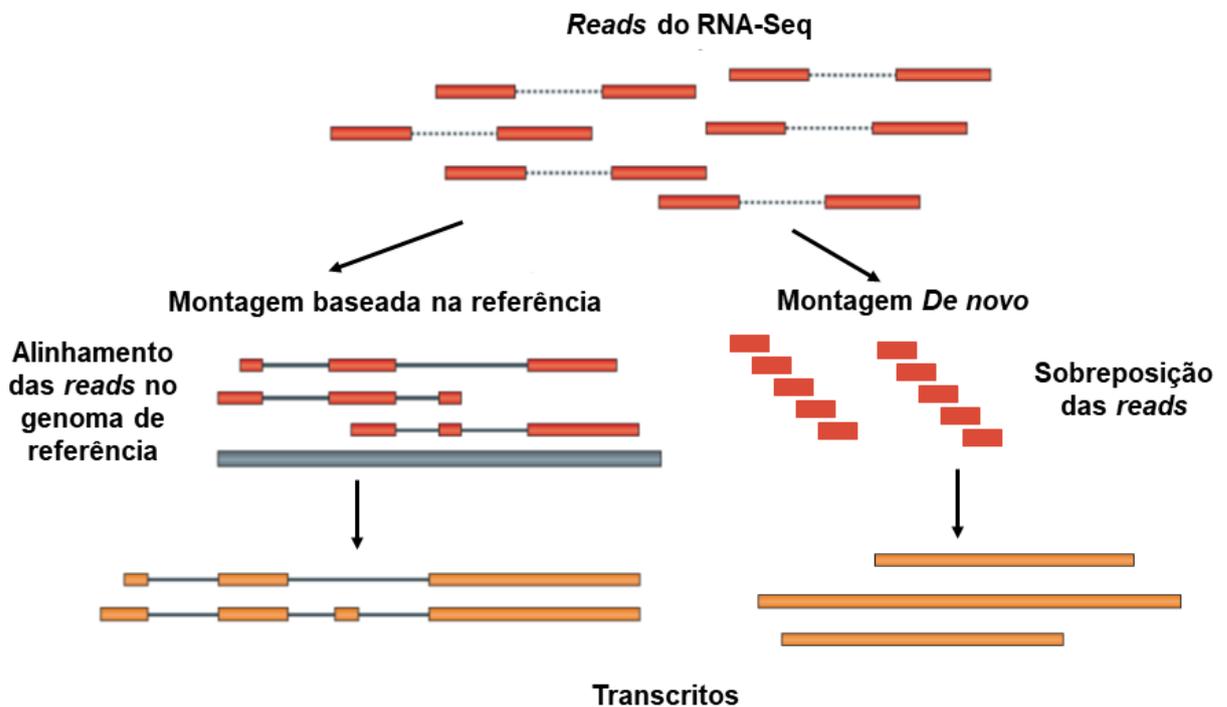
O sequenciamento é feito em uma das plataformas NGS, as mais utilizadas incluem Illumina, IonTorrent (short-reads) e PacBio (long-reads). Atualmente,

Illumina é a plataforma dominante, sendo a mais utilizada em publicações envolvendo RNA-Seq (STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019).

Os dados brutos de um experimento de RNA-Seq incluem milhões de *reads* geradas pelas plataformas NGS e disponibilizadas em arquivos, por exemplo, em formato FASTQ, que são submetidos às análises de bioinformática (SIMONEAU; SCOTT, 2019). Primeiramente, há um pré-processamento dos dados brutos para remoção de artefatos e erros de sequenciamento, em seguida as *reads* são montadas para reconstrução original dos transcritos (MARTIN; WANG, 2011).

O processo de montagem do transcriptoma inclui duas abordagens, a montagem baseada em referência, quando há um genoma sequenciado disponível, e a montagem *De novo* (Figura 6).

Figura 6. Estratégias de montagem de transcriptoma obtido via RNA-Seq.



Fonte: Adaptado de Martin; Wang (2011).

Na montagem baseada em referência, inicialmente as *reads* são alinhadas ao genoma de referência, seguido pela sobreposição e formação do gráfico representativo de todas as isoformas dos transcritos (GARG; JAIN, 2013). A estratégia de montagem *De novo* utiliza-se da redundância das *reads* para encontrar pontos de sobreposição, o que permite reconstruir os transcritos (MARTIN; WANG, 2011). A estratégia de montagem *De novo* é extremamente importante para espécies que não possuem genoma sequenciado, além de permitir a detecção de transcritos novos e *trans-splicing* (ROBERTSON et al., 2010).

Após a montagem, realiza-se a quantificação dos níveis de expressão. Um dos objetivos comum aos experimentos de RNA-Seq é identificar genes diferencialmente expressos entre condições distintas (VERK et al., 2013). Para garantir uma comparação precisa é necessário normalizar os dados, no qual RPKM/FPKM (reads or paired-end fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) são os principais métodos de normalização (LI et al., 2015). Entre os inúmeros softwares existentes, Cuffdiff2, dESeq e edgeR são os mais utilizados na análise da expressão diferencial em dados de RNA-Seq (ZHANG et al., 2014).

Análises de transcriptomas de plantas via RNA-Seq têm expandido-se radicalmente nos últimos anos. Um exemplo disso foi o projeto “Iniciativa de 1000 transcriptomas de plantas (1KP)” que sequenciou o transcriptoma de 1173 espécies incluindo representantes dos principais táxons de Viridiplantae (algas verdes, briófitas, samambaias, gimnospermas e angiospermas). Os achados desse projeto sugerem a ocorrência de extensas expansões de famílias gênicas e a duplicação de todo o genoma como eventos antecessores às principais inovações na história evolutiva das plantas verdes (LEEBENS-MACK et al., 2019; CARPENTER et al., 2019).

Além disso, inúmeros estudos têm empregado a metodologia de RNA-Seq para análise da expressão de genes envolvidos na resposta das plantas a estresses bióticos e abióticos, sendo extremamente úteis para o melhoramento vegetal (HERNÁNDEZ, 2019).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ARTIGO 1

#### **Análise do transportoma de *Jatropha curcas* submetida à salinidade (150 mM NaCl)**

Maria Fernanda da Costa Gomes<sup>1</sup>, Eliseu Binneck<sup>2</sup>, José Ribamar Costa Ferreira Neto<sup>1</sup>, Gizele de Andrade Luz<sup>1</sup>, Ana Maria Benko Iseppon<sup>1</sup>, Marcelo Francisco Pompelli<sup>3</sup>, Lauricio Endres<sup>4</sup>, Éderson Akio Kido<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Pernambuco (UFPE), Bioscience Center, Department of Genetics, 50670-420 Recife, PE, Brazil

<sup>2</sup>Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), EMBRAPA-Soybean, 86001970 Londrina, PR, Brazil

<sup>3</sup>Federal University of Pernambuco (UFPE), Bioscience Center, Department of Botany, 50670-901 Recife, PE, Brazil

<sup>4</sup>Federal University of Alagoas (UFAL), Agricultural Sciences Center, 57072-970 Maceio, AL, Brazil

\*Corresponding author, e-mail: ederson.kido@ufpe.br

#### **Resumo**

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma oleaginosa tolerante à seca, tornando-se uma boa fonte para a produção de biocombustíveis em regiões áridas e semiáridas. Porém, nessas regiões, a salinização do solo é um problema que compromete a produtividade das lavouras. Estudos prévios mostram que famílias gênicas codificadoras de proteínas de transporte de membrana (PTM) desempenham um papel fundamental na tolerância das plantas à salinidade. Assim, comparamos o transcriptoma RNA-Seq de dois genótipos de *J. curcas* (sensível versus tolerante) após três horas de exposição ao NaCl (150 mM) para identificar os transcritos codificadores de PTM expressos na resposta inicial ao sal. Identificamos, via BLASTx  $e\text{-value} \leq 10^{-10}$  e análise de domínio proteico, um transportoma compreendendo 2.279 transcritos PTM classificados em 61 famílias. A análise destacou as famílias F-ATPase, MC, MFS e MIP na resposta inicial ao sal. As F-ATPases atuam no sequestro vacuolar de Na<sup>+</sup> e minimizam do estresse oxidativo, enquanto os transportadores mitocondriais (família MC) reduzem os níveis de ROS mitocondrial. Por sua vez, os transportadores de açúcar (família MFS) reforçam o ajuste osmótico, a reabsorção de monossacarídeos e mantêm a estabilidade da membrana celular, enquanto as aquaporinas (família MIP) contribuem para o acúmulo de prolina e enzimas antioxidantes, facilitando a desintoxicação de ROS. Os resultados de RT-qPCR confirmaram a maior parte da regulação positiva *in silico* (60,0%) dos alvos que podem ser potenciais marcadores moleculares funcionais. Por sua vez, Fatores de transcrição (FTs) das famílias TCP, ERF e NAC, previstos regulando exclusivamente promotores de genes PTM induzidos, representam bons candidatos a transgenes. Assim, nossos dados contribuem para decifrar a resposta inicial do pinhão-manso ao sal, e esses dados podem ajudar a melhorar a tolerância das plantas à salinidade.

**Palavras-chave:** Pinhão manso. RNA-Seq. Salinidade. Transportadores de membrana.

## Introdução

A salinização do solo representa um grande problema para a agricultura, limitando o crescimento e a produtividade das plantas (NEGRÃO; SCHMÖCKEL; TESTER, 2017). O fenômeno ocorre globalmente, notadamente em regiões áridas e semi-áridas, e comumente quando a água fornecida para irrigação das culturas é inadequada (MBARKI et al., 2018; PARIHAR et al., 2015). Inicialmente, o estresse osmótico pode provocar perda de água pelas raízes, comprometendo o desenvolvimento da planta (FORMENTIN et al., 2018). Por sua vez, o estresse iônico pode induzir toxicidade às células vegetais. Assim, o estresse salino pode influenciar os principais processos da planta, como germinação, fotossíntese, relação hídrica, nutrição, crescimento e produção agrícola (PARIHAR et al., 2015).

*Jatropha curcas* L. é uma planta perene da família Euphorbiaceae, cuja importância econômica se deve, principalmente, ao seu potencial para produção de biocombustíveis, devido ao teor de óleo de alta qualidade (40-50%) nas sementes (WANG et al., 2018; PECINA-QUINTERO et al., 2014). *J. curcas* também é relatada como uma planta tolerante à seca (KAMEL et al., 2018), mas relativamente sensível à salinidade do solo (SILVA et al., 2011), e este fator abiótico pode limitar o seu cultivo em regiões tropicais.

Abordagens transcriptômicas fornecem identificação de genes diferencialmente expressos em plantas expostas ao estresse abiótico, ajudando a entender os mecanismos de tolerância. Estudos prévios relatam a associação das proteínas de transporte de membrana (PTM) ou transportadores de membrana à resposta de tolerância ao sal. Entre os genes PTM que apresentam expressão diferencial em plantas sob condições de salinidade estão aqueles envolvidos no transporte de cátions (HKT, CNGC, KAT), ânions (CLC), substratos orgânicos (transportadores de açúcar) e água (aquaporinas) (SENADHEERA; SINGH; MAATHUIS, 2009; FORMENTIN et al., 2018).

Estudos de transgenia confirmam o papel dos genes PTM na tolerância ao sal em vegetais. A superexpressão do transgene SbHKT1 em algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e AtHKT1 em batata (*Solanum tuberosus* L.) promovem o equilíbrio iônico  $K^+/Na^+$  e a eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em plantas sob

estresse salino (GUO et al., 2020; WANG et al., 2019). Além disso, as plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o transportador de açúcar OsMST6 (transportador de monossacarídeo) exibem tolerância ao sal, devido a diminuição da perda de água e aumento da estabilidade da membrana celular (MONFARED et al., 2020). Assim, os transportadores de membrana desempenham um papel relevante na adaptação das plantas ao estresse salino (SHABALA et al., 2016).

Considerando os estudos transcriptômicos de raízes de *J. curcas* sob estresse de sal (ZHANG et al., 2014; SOUZA et al., 2020; CABRAL et al., 2020), o potencial dos genes/transcritos PTM permanece inexplorado. Assim, analisamos e comparamos os perfis transcriptômicos de dois genótipos contrastantes de *J. curcas* (sensível versus tolerante ao sal) para identificar os genes que codificam os candidatos PTM expressos na resposta inicial ao sal. Este trabalho relata o primeiro transcriptoma (conjunto com diversos transportadores de membrana) identificado por RNA-Seq em raízes de *J. curcas* após exposição ao sal (NaCl 150 mM - 3h).

## **Metodologia**

### **Origem dos dados de RNA-Seq e montagem do transcriptoma**

O ensaio de RNA-Seq foi relatado pela primeira vez por Souza et al. (2020) e Cabral et al. (2020). Foram utilizados dois acessos brasileiros, previamente relatados quanto às suas respostas ao NaCl como tolerante ao sal Jc183 (Embrapa Agroenergia) e o moderadamente tolerante Jc171 (UFAL / CECA, Alagoas) (LOZANO-ISLA et al., 2018), aqui referido como sensível ao sal. Em resumo, o ensaio de NaCl forneceu 12 bibliotecas de RNA-Seq, de acordo com a distribuição em um delineamento inteiramente casualizado, dois tratamentos (sem sal ou três horas de exposição a NaCl 150 mM) e três plantas meia-irmãs de cada acesso. Após o tratamento com NaCl, as raízes foram coletadas, imediatamente congeladas (nitrogênio líquido) e mantidas a -80 °C até a extração do RNA total (kit SV Total RNA Isolation System, Promega). Amostras de RNA mostrando qualidade (razões A260/280 nm e A230/280 nm próximo de 2,0), quantidade (equipamento Nanodrop) e integridade (integridade de RIN  $\geq$  9, Agilent Bioanalyzer 6000) forneceram as 12 bibliotecas de RNA-Seq, que foram geradas e sequenciadas (2 × 100 bp *par-end-reads*) usando a plataforma Illumina HiSeq2500 da ESALQ Genomic Core Facility (Piracicaba - SP, Brasil).

A montagem do transcriptoma também é descrita em Souza et al. (2020) e Cabral et al. (2020). Resumidamente, os dados brutos foram analisados quanto à qualidade (FastQC; <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) antes e depois da filtragem inicial realizada no Trimmomatic (v.0.36; BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) para remover *reads* e adaptadores de baixa qualidade. Apenas pares de *reads* de alta qualidade (Phred  $\geq 30$ , para todas as bases) foram usados para montar o transcriptoma *De novo* com o programa Trinity 2.2.0 (GRABHERR et al., 2011). A abundância dos transcritos expressos em cada biblioteca foi normalizada por *fragments per kilobase per million mapped reads* (FPKM) usando o software RSEM (LI; DEWEY, 2011). A qualidade do transcriptoma *De novo* foi avaliada pelo software rnaQUAST-1.5.2 (BUSHMANOVA et al., 2016) usando o genoma de referência Jatcur 1.0 (GenBank, acesso GCA\_00696525.1) e parâmetros padrão.

### **Recuperação dos candidatos a PTM no transcriptoma RNA-Seq de *J. curcas***

Os transcritos RNA-Seq foram alinhados via análise BLASTx (*e-value*  $\leq 10^{-10}$ ) contra um conjunto proteico PTM curadas de *A. thaliana* (1102 sequências de proteínas de 61 famílias gênicas) oriundas do banco de dados TransportDB ([www.membranetransport.org/transportDB2/index.html](http://www.membranetransport.org/transportDB2/index.html)) para identificar os candidatos a PTM de *J. curcas*. Potenciais unigenes de *J. curcas* que codificam PTM foram traduzidos *in silico* usando o software BioEdit (tamanho mínimo da ORF: 10 aminoácidos), e os respectivos ORFs submetidos à análise de domínio usando a ferramenta HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Ferramentas/hmmer/search/hmmscan>).

### **Análise *in silico* de candidatos a PTM diferencialmente expressos em resposta ao NaCl (150 mM)**

Unigenes diferencialmente expressos (DEGs) foram identificados usando o pacote edgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010). Unigenes com valores  $\text{Log}_2\text{FoldChange}$  ( $\text{Log}_2\text{FC}$ )  $\geq 1$  (modulação positiva ou indução, UR) ou  $\leq -1$  (modulação negativa ou repressão, DR), *p-value*  $\leq 0,0001$  e taxa de falsa descoberta (FDR)  $\leq 0,005$  foram considerados DEGs.

### **Validação da expressão gênica por RT-qPCR**

Os ensaios RT-qPCR permitiram validar a expressão *in silico* dos unigenes e verificar a confiabilidade dos dados de RNA-Seq. Quinze candidatos PTM (quatro famílias) foram selecionados para os ensaios RT-qPCR com base na expressão *in silico* dos unigenes considerando as famílias que apresentam um maior número de

DEGs induzidos (Tabela S1). Os *primers* foram desenhados com a ferramenta Primer3 (Untergasser et al., 2012), aplicando-se os seguintes parâmetros: tamanho do amplicon - 80 a 150 bp; temperatura de desnaturação - 58 ° C (mínimo), 60 ° C (ótimo) e 62 ° C (máximo), e conteúdo de GC - 45 a 55% (Tabela S1).

Os RNAs foram extraídos das raízes de *J. curcas* usando um protocolo híbrido modificado (CTAB/coluna de sílica Quiagen) (CHANG; PURYEAR; CAIRNEY, 1993; Oliveira, 2018), e os cDNAs foram obtidos usando o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega Corp., EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação quantitativa dos genes em tempo real foi realizada usando o sistema de detecção SYBR Green (Go Taq qPCR Master Mix - Promega) no termociclador LineGene 9600 (Bioer, Hangzhou, China). As reações de RT-qPCR incluíram três plantas meio-irmãs do acesso Jc171, simulando triplicatas biológicas; triplicatas técnicas; controle negativo e dois genes de referência - actina e  $\beta$ -tubulina (SOUZA et al., 2020; CABRAL et al., 2020), relatados anteriormente usando os mesmos dados de RNA-Seq. As reações ocorreram conforme a programação: desnaturação inicial – 95°C por 2min, 40 ciclos – 95°C por 15 segundos seguido de 60°/1min. Após a ciclagem, para obter a curva de dissociação, os amplicons foram submetidos a 65°C e 95°C durante 20 minutos.

Os valores Cq e as quantificações absolutas e relativas foram obtidos pelo software LineGene (v.1.1.10). Os dados de expressão relativa consideraram um teste de randomização com 10.000 permutações e um teste de hipótese para verificar diferenças significativas entre os grupos de controle e tratamento no programa REST (Relative Expression Software Tool v.2.0.13; PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).

### **Análise de enriquecimento de fatores de transcrição (FTs)**

A análise de enriquecimento de fatores de transcrição (FTs) ( $p$ -value  $\leq 0,01$ ) prevendo FTs superrepresentados, possivelmente regulando genes que codificam PTM foi realizada usando a ferramenta PlantRegMap ([plantregmap.cbi.pku.edu.cn/](http://plantregmap.cbi.pku.edu.cn/); JIN et al., 2016), e três arquivos de entrada independentes (unigenes UR, DR e ns). Os resultados foram apresentados em um diagrama de Venn gerado pela ferramenta online Venny (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

## Resultados

As 12 bibliotecas RNA-Seq das raízes de *J. curcas* considerando o acesso tolerante Jc183 e o acesso sensível ao sal Jc171, obtidas após três horas de exposição ao sal (NaCl 150 mM), forneceram 238.286.823 *reads* brutas (230.140.599 mostrando pontuação de *Phred* > 30) que geraram 145.422 transcritos (101 Mb) e 126.342 unigenes (76Mb) com conteúdo GC 41,55%. A análise no rnaQUAST confirmou a boa qualidade da montagem *De novo* do transcriptoma (SOUZA et al., 2020).

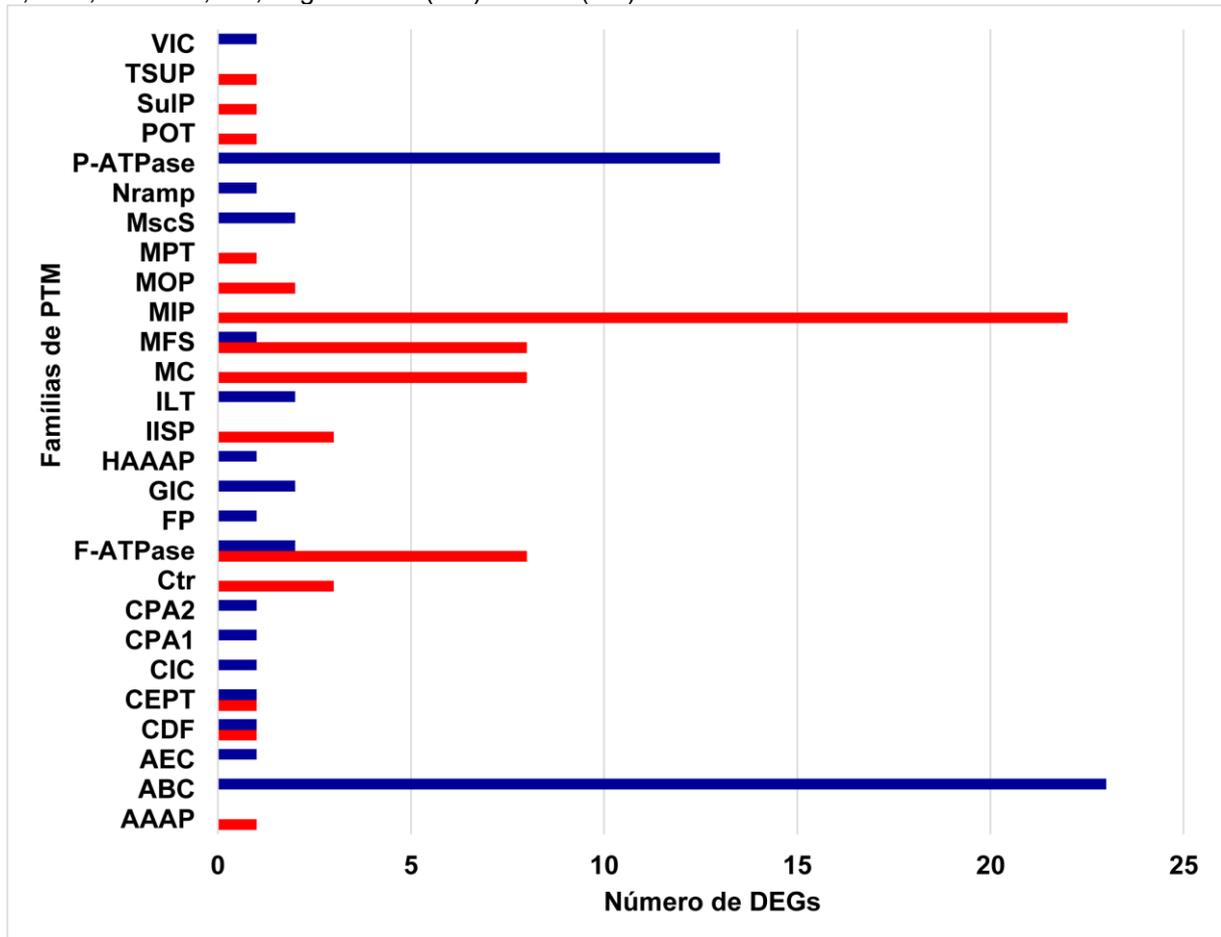
### Identificação e anotação dos transcritos PTM em *J. curcas* após exposição ao sal

Com base em alinhamentos BLASTx (*e-value*  $\leq 10^{-10}$ ) contra 1.102 sequências de proteínas de *A. thaliana* curadas (61 famílias PTM) e análise de domínio de proteínas, um total de 2.279 transcritos de *J. curcas* foram identificados, correspondendo a 1.792 unigenes codificando PTM putativos (Tabela S2). As famílias PTM que apresentaram o maior número de transcritos identificados foram F-ATPase (332), MC (299), ABC (277) e MFS (182), representando aproximadamente 48% dos potenciais transcritos PTM expressos após a exposição salina. Além disso, outras 26 famílias, compreendendo cerca de 43% dos transcritos identificados, apresentaram até 10 transcritos cada (Tabela S2).

### Perfil de expressão dos candidatos PTM *J. curcas* após exposição a solução salina

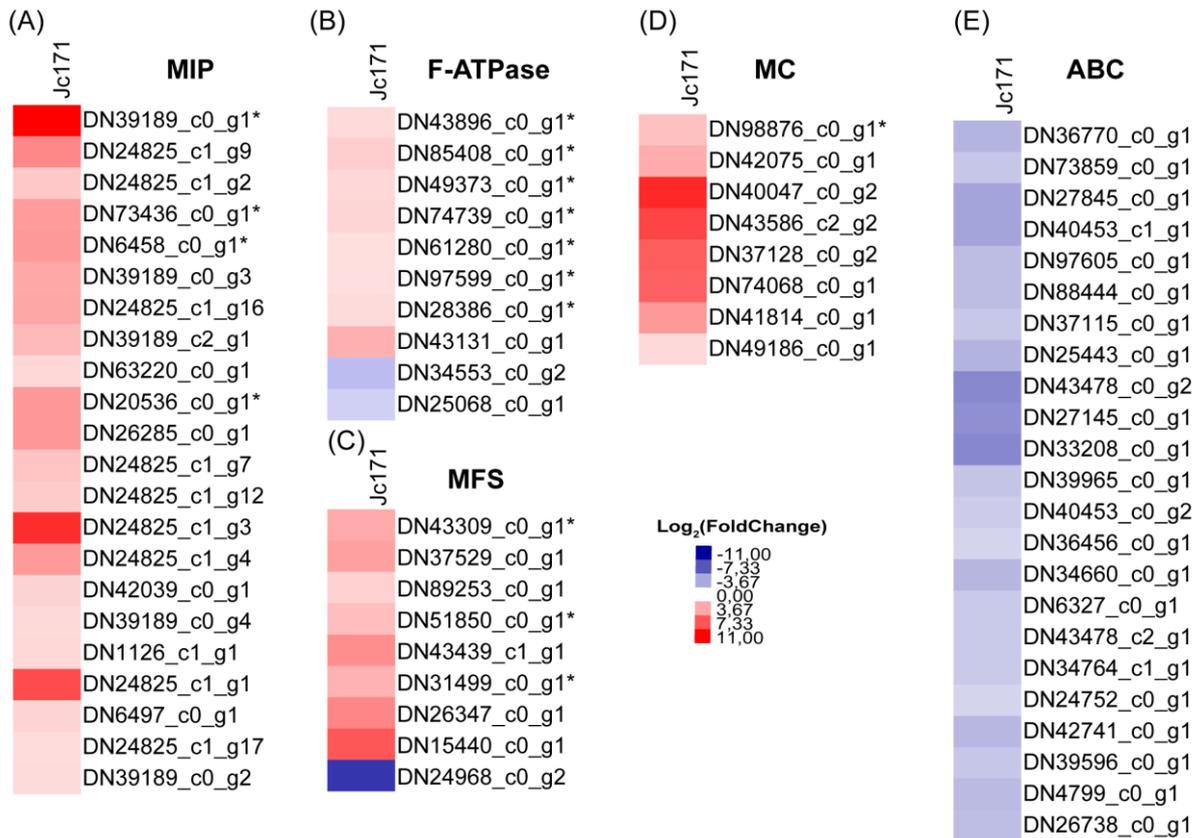
Considerando os unigenes PTM diferencialmente expressos (DEG, *p-value*  $\leq 0,0001$ , FDR  $\leq 0,005$ , Log2 FC  $\geq 1$  ou  $\leq -1$ ), detectamos 116 no perfil de expressão do acesso Jc171 ao sal e apenas um no Jc183. Com base no número DEGs e na maior modulação da expressão gênica pelo Jc171, após o estímulo salino, as análises seguintes consideraram apenas aquele acesso. Os 116 potenciais DEGs PTM detectados no Jc171 corresponderam a 61 UR e 55 DR (Figura 1) caracterizados em 27 das 61 famílias (Tabela S3).

Figura 1. Famílias de proteínas de transporte de membrana (PTM) com unigenes diferencialmente expressos (DEGs) de *J. curcas* após 3h de exposição ao sal (150 mM NaCl). DEGs induzidos (UR) e reprimidos (DR) são representados, respectivamente, por barras vermelhas e azuis. DEGs: valor  $p \leq 0,0001$ ,  $FDR \leq 0,005$ ,  $\text{Log}_2 \text{FC} \geq 1$  (UR) ou  $\leq -1$  (DR).



As famílias que mostraram mais representantes induzidos foram MIP (22, Figura 2A), F-ATPase (08, Figura 2B), MFS (08, Figura 2C) e MC (8, Figura 2D), enquanto que a família ABC mostrou mais membros reprimidos (23, Figura 2E). Por sua vez, o perfil da resposta ao sal de Jc171 que não apresentou DEGs compreendeu 327 unigenes (declarados n.s.) associados a 34 famílias PTM.

Figura 2. *Heatmaps* baseados na modulação da expressão gênica de membros das famílias PTM (Proteínas de transporte de membranas) identificados em raízes de *Jatropha curcas* (Jc171) após exposição de 3h a NaCl (150 mM), em relação ao controle negativo sem sal (valores Log<sub>2</sub>FC). A indução e repressão dos genes diferencialmente expressos são indicados em vermelho e azul, respectivamente, e a intensidade das cores está de acordo com a legenda. Os asteriscos (\*) identificam DEGs selecionados para a análise RT-qPCR.



### Validação da expressão de DEGs PTM por meio da análise RT-qPCR

Dados de expressão *in silico* relativos a 15 DEGs PTM induzidos de quatro famílias [F-ATPase (07), MC (01), MFS (03) e MIP (04)] com destaque no perfil da resposta do Jc171 ao sal foram validados por ensaios RT-qPCR. Ambos, os DEGs PTM selecionado e genes de referência apresentaram os amplicons esperados de acordo com as curvas de dissociação (Figura S1). Além disso, os parâmetros RT-qPCR derivados das curvas padrão obtidas com as diluições em série das amostras de cDNA, incluindo a eficiência de amplificação (E), o declive (S) e o coeficiente de correlação (R), foram adequados. Adicionalmente, todos os *primers* utilizados nas reações apresentaram valores aceitáveis, conforme preconizado pelo protocolo MIQE (BUSTIN et al., 2009). Os resultados de RT-qPCR (Tabela 1) confirmaram a maioria dos dados de expressão *in silico* (60,0%), incluindo a expressão UR de dois candidatos das famílias MFS (DN43309\_c0\_g1) e F-ATPase (DN28386\_c0\_g1).

Ambas as sequências não apresentaram semelhanças significativas com as sequências de *J. curcas* do RefSeq (NCBI - 05/2021).

Tabela 1. Expressão gênica relativa e parâmetros de RT-qPCR [eficiência de amplificação (E), declive (S), coeficiente de correlação (R) e interceptação Y] derivados de transcritos codificadores de proteínas de transporte de membrana de *Jatropha curcas* L. expressos em raízes após 3 h de exposição salina (150 mM NaCl).

Família	Gene (candidato ou referência <sup>a</sup> )	E (%)	R	S	Y Intercept	Expressão Gênica
F-ATPase	DN85408_c0_g1	91,14	-0,997	-3,55	32,59	1,121 (n.s.)
	DN49373_c0_g1	91,99	-0,996	-3,53	32,48	1,236 (UR)
	DN74739_c0_g1	90,62	-0,992	-3,57	31,91	1,239 (n.s.)
	DN28386_c0_g1 <sup>a</sup>	94,66	-0,997	-3,46	32,15	1,362 (UR)
	DN43896_c0_g1	93,86	-0,995	-3,48	33,31	1,237 (n.s.)
	DN61280_c0_g1	95,79	-0,987	-3,43	31,51	1,620 (UR)
	DN97599_c0_g1	93,03	-0,998	-3,50	30,90	1,269 (n.s.)
MC	DN98876_c0_g1 <sup>a</sup>	90,90	-0,995	-3,56	35,70	1,083 (n.s.)
MFS	DN31499_c0_g1	109,2 2	-0,981	-3,12	36,40	0,717 (DR)
	DN51850_c0_g1	94,02	-0,991	-3,47	37,63	9,273 (UR)
	DN43309_c0_g1 <sup>a</sup>	99,48	-0,988	-3,33	36,75	3,124 (UR)
MIP	DN39189_c0_g1	92,65	-0,999	-3,51	30,16	2,003 (UR)
	DN6458_c0_g1	94,76	-0,998	-3,45	32,77	5,566 (UR)
	DN73436_c0_g1	102.9 4	-0,998	-3,25	31,50	4,577 (UR)
	DN20536_c0_g1	90.66	-0,994	-3,57	34,84	4,640 (UR)
Genes de Referência	JcActin <sup>b</sup>	90.15	-0,998	-3,58	26,99	
	Jc $\beta$ -tubulin <sup>b</sup>	96.00	-0,986	-3,42	30,90	

<sup>a</sup>Alvo sem similaridade significativa com sequências de *J. curcas* do RefSeq (NCBI); <sup>b</sup>Genes de referência: actina e  $\beta$ -tubulina (Souza et al., 2020; Cabral et al., 2020).

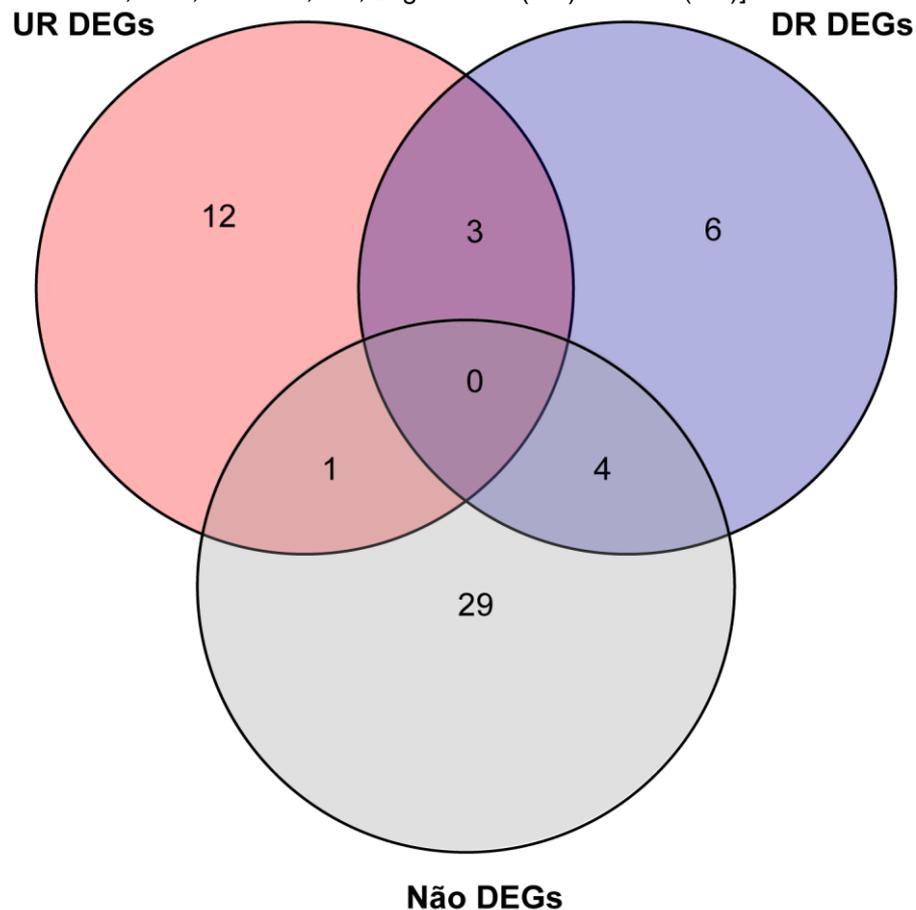
### **Análise de enriquecimento de fatores de transcrição (FTs) associados a transcritos PTM do perfil da resposta salina de *Jc171***

Considerando os DEGs PTM induzidos (61) como os genes a serem regulados, a análise de enriquecimento FT previu 476 regulações por 172 FTs, e 16 foram considerados enriquecidos. Em relação aos DEGs PTM reprimidos (55), 526

regulações envolveram 178 FTs, dos quais 13 foram enriquecidos. Sobre os unigenes não DEGs (1.676) 7.489 regulações foram previstas envolvendo 301 FTs, onde 34 foram enriquecidos. Os FTs enriquecidos de cada grupo (UR, DR e ns), respectiva família de FT e número de genes alvo potencialmente regulados são apresentados na Tabela S4.

Comparando os três conjuntos de FTs enriquecidos em um diagrama de Venn, 12 FTs foram exclusivamente associados aos DEGs PTM induzidos (Figura 3), onde cinco são membros da família TCP. Além disso, o FT Jcr4S02314.30 (membro da família ERF) foi previsto para regular até seis dos DEGs PTM induzidos. Outros FTs enriquecidos exclusivamente com os DEGs PTM induzidos por sal são membros das famílias NAC (3), HD-ZIP (1) e MYB (1) (Tabela S4).

Figura 3. Diagrama de Venn comparando os fatores de transcrição enriquecidos ( $p$ -valor  $\leq 0,01$ ) identificados (ferramenta PlantRegMap) para cada grupo de candidatos PTM (Proteínas de Transporte de Membrana): induzidos (UR), reprimidos (DR) ou não DEGs [Gens Diferencialmente expressos:  $p$ -value  $\leq 0,0001$ , FDR  $\leq 0,005$ , Log2FC  $\geq 1$  (UR) ou  $\leq -1$  (DR)].



## Discussão

Proteínas de transporte de membrana (PTM) ou transportadores de membrana são essenciais na resposta das plantas à salinidade. Eles absorvem, sequestram e transportam íons e outras moléculas de forma seletiva, contribuindo para a homeostase celular (VISHWAKARMA et al., 2019). O presente estudo analisou transcritos de RNA-Seq associados as proteínas de transporte de membrana (PTM), destacando as principais famílias expressas em raízes de *J. curcas* após 3h de exposição a NaCl (150 mM).

Os perfis transcriptômicos dos dois acessos de *J. curcas* revelaram diferentes respostas após o tratamento de sal aplicado. O acesso Jc183 tolerante a sal quase não modulou os transcritos identificados associados a PTM; apenas um DEG (membro da família MFS) dos 83 relatados por Souza et al. (2020). Jc183 é um genótipo elite tolerante ao sal que recupera eficientemente os danos causados por choque de alta salinidade (NaCl 750 mM) (SANTOS et al., 2019). Assim, o tratamento com NaCl 150 mM não provocou danos visíveis ao sal nas folhas de Jc183, como os mostrados pelo acesso Jc171 (Souza et al., 2020; Cabral et al., 2020). Porém, a dosagem de NaCl aplicada é suficiente para comprometer as mudas de Jc171 (SOUZA et al., 2020). Comparando os dados transcriptômicos de *J. curcas* de ambos os acessos, Jc171 apresentou mais transcritos de RNA-Seq modulando suas expressões, inclusive envolvendo potenciais PTM. Estudo prévio relata resultados semelhantes. O tratamento com sal (30 min., 200 mM NaCl) induziu mais alterações transcriptômicas no genótipo de quinoa sensível ao sal (*Chenopodium quinoa*) do que no tolerante (VITA et al., 2021).

Considerando os dados RNA-Seq do Jc171, a análise do transcriptoma destacou as famílias PTM F-ATPase, MC, ABC e MFS, com base no número de transcritos identificados (Tabela S2). Os transportadores F-ATPase e ABC são dependentes de ATP e requerem uma fonte primária de energia (por exemplo, hidrólise de ATP) para realizar o processo de transporte, enquanto MC e MFS são transportadores secundários, usando um gradiente eletroquímico de íons ou solutos (por exemplo, próton/força motora de sódio) para conduzir o processo de transporte (REN; KANG; PAULSEN, 2004).

A família F-ATPase compreende um complexo de proteínas com múltiplas subunidades operando como bombas de prótons no transporte de solutos através das membranas, incluindo a membrana dos vacúolos (WANG et al., 2016). As F-

ATPases desempenham um mecanismo central para evitar os efeitos tóxicos do sódio no citosol, através do sequestro de íons  $\text{Na}^+$  nos vacúolos (LV et al., 2017; HE et al., 2014). A superexpressão de diferentes subunidades de ATPase do trigo levou à compartimentação de sódio nos vacúolos de plantas transgênicas de *A. thaliana*, promovendo tolerância à salinidade (HE et al., 2014).

As ATPases também estão envolvidas no controle do estresse oxidativo. Plantas transgênicas de alfafa com superexpressão de ScATPase (*Suaeda corniculata*) mostraram maior tolerância à salinidade, maior conteúdo de prolina e maior atividade da enzima SOD (superóxido dismutase) (WANG et al., 2016). Além disso, a superexpressão da subunidade c de ATPase vacuolar em plantas transgênicas de *A. thaliana* reduziu os níveis de  $\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , proporcionando maior tolerância das plantas ao sal (WANG et al., 2020). No presente trabalho, os resultados de RT-qPCR confirmaram a superexpressão de três candidatos F-ATPase (codificando potencial ATPase vacuolar subunidade c), sugerindo sequestro vacuolar de  $\text{Na}^+$  e minimização do estresse oxidativo. A indução de F-ATPases pelo acesso Jc171 (Figuras 1 e 2B) representa um possível mecanismo de controle da toxicidade iônica causada pelo sódio. A regulação positiva das F-ATPases de *J. curcas* foi demonstrada em plantas após duas horas de exposição a NaCl 100 mM (ZHANG et al., 2014).

Dados de RT-qPCR apontam para a indução da ATPase vacuolar subunidade c na resposta salina inicial (6 h) em raízes da halófita *Tamarix hispida* (NaCl 0,4 mol.L<sup>-1</sup>). Além disso, a superexpressão de subunidades de ATPase vacuolar em plantas transgênicas melhorou as características agronômicas de plantas sob salinidade. A superexpressão da ATPase subunidade c de *A. thaliana* em plantas transgênicas *Hordeum vulgare* melhorou o rendimento de grãos e a produção de biomassa em comparação com plantas do tipo selvagem sob condição de NaCl 300 mM (ADEM et al., 2017).

A família MC corresponde aos transportadores mitocondriais, e os membros desta família foram bem representados no transcriptoma do Jc171 (Tabela S2). Transportadores MC estão localizados na membrana mitocondrial interna carregando uma variedade de metabólitos entre as mitocôndrias e o citosol (JIA et al., 2015). Embora o papel dos transportadores MC na resposta das plantas ao sal seja limitado, uma expressão aumentada do transportador mitocondrial UCP1 (*Uncoupling protein 1*) foi relatada em folhas e raízes de *A. thaliana*, após 3 e 27

horas, respectivamente, em plantas expostas a 100 mM NaCl (CHE-OTHMAN et al., 2017). Além disso, a superexpressão do UCP1 *A. thaliana* em plantas de arroz transgênicas (*Oriza sativa*) conferiu tolerância à salinidade (175 mM NaCl), reduzindo o nível de ROS mitocondrial (BEGCY et al., 2011). Assim, a superexpressão de membros da Família MC em *J. curcas* (Figura 2D) pode ser um mecanismo para minimizar os danos do estresse oxidativo causados pelo sal.

A família ABC compreende proteínas que transportam ativamente íons, fitohormônios, ácidos orgânicos e metabólitos secundários, agindo diretamente no crescimento e desenvolvimento das plantas (LOPEZ-ORTIZ et al., 2019; OFORI et al., 2018). A regulação positiva da maioria dos genes ABC no acesso tolerante de *Pennisetum glaucum* (L) R. Br após estresse salino (18 h, 250 mM NaCl) destacou os membros ABC na resposta das plantas ao sal (SHINDE et al., 2018). Comparando dois genótipos de arroz (*O. sativa*), apenas o acesso tolerante apresentou transportadores ABC induzidos em plantas após 24 h de exposição a NaCl 100 mM, o que levou a menor razão  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  quando comparado ao acesso sensível (MANSURI et al., 2019). A indução de transportadores ABC também auxilia na absorção de íons potássio (K), contribuindo para a homeostase do  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e a tolerância a sais em plantas (AMIRBAKHTIAR et al., 2019). Além disso, as plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando transportadores ABC exibiram tolerância à salinidade (24 h, NaCl 50 mM; Kim et al., 2010). No presente estudo, apesar da família ABC estar bem representada no perfil RNA-Seq do Jc171, essa família apresentou o maior número de DEGs reprimidos (Figura 2E), e essa regulação pode contribuir para o fenótipo menos tolerante do Jc171.

MFS (*Major Facilitator Superfamily*) compreende uma das maiores famílias PTM, incluindo transportadores de açúcar. O transporte e a distribuição de açúcares pela planta são essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta, e é crucial na resposta das plantas ao estresse (JULIUS et al., 2017). Açúcares solúveis sintetizados por plantas, como glicose, sacarose e outros, desempenham um ajuste osmótico no nível celular. Os açúcares estabilizam as membranas plasmáticas e o protoplasma, além de fornecerem carbono e energia para as sínteses orgânicas (LIANG et al., 2018). Essas moléculas aliviam o estresse iônico, estimulam as vias de sinalização e protegem proteínas e enzimas de danos induzidos pelo sal (FENG et al., 2019; KHAN; AHMAD; KHAN, 2015).

O aumento do conteúdo de açúcares solúveis nas raízes sob condições salinas (24-72 h, 200 mM NaCl) foi relatado (FENG et al., 2019; KHAN; AHMAD; KHAN, 2015). Além disso, a indução de transportadores de açúcar em plantas sob estresse salino leva à reabsorção de monossacarídeos que foram perdidos após danos nas células epidérmicas das raízes. Essa reabsorção é um mecanismo adaptativo ao estresse osmótico, uma vez que provoca o aumento da pressão osmótica celular e reduz a perda de nutrientes (YAMADA et al., 2011). O equilíbrio osmótico de Jc171 provavelmente envolve a superexpressão de transportadores de açúcar da superfamília MFS (Figura 2B). Os membros desta superfamília se destacaram no perfil expresso do Jc171 ao sal. Um estudo com *Manihot esculenta*, outra Euphorbiaceae, mostrou a maioria dos transportadores de açúcar expressos nas raízes, contribuindo para o crescimento do órgão (LIU et al., 2018). Além disso, as plantas transgênicas de *A. thaliana* que superexpressam o transgene OsMST6 de arroz, o que aumentou a estabilidade da membrana e diminuiu a perda de água, garantindo o ajuste osmótico (MONFARED et al., 2020).

A indução de transportadores de açúcar também foi associada à tolerância das plantas ao estresse oxidativo, uma vez que participam das vias de eliminação de ROS (ZHOU et al., 2018). Nossos resultados de RT-qPCR confirmaram a superexpressão do membro da família MFS (DN51850\_c0\_g1 - Tabela 1), um candidato a transportador ZIF-11 (*Zinc induced facilitator-like 1*), provavelmente associado à homeostase do zinco em plantas. O zinco é um micronutriente que reduz a formação de ROS e ativa enzimas e compostos antioxidantes, minimizando os danos do estresse oxidativo causados pela salinidade (JAN et al., 2017). Assim, a indução de ZIF-L1 em raízes de *J. curcas* pode sugerir um mecanismo contra o estresse oxidativo causado pelo tratamento com NaCl. A superexpressão de transportadores MFS em raízes de *J. curcas* implicaria, portanto, em uma absorção, transporte e distribuição de açúcares mais eficientes, ajudando a controlar os danos causados por estresse osmótico e oxidativo, e desequilíbrio iônico. Além disso, outro transcrito validado por RT-qPCR (DN43309\_c0\_g1, Tabela 1) poderia ser um novo candidato a PTM (família MFS) por apresentar domínio de transporte de açúcar (MST, transportadores de monossacarídeo - IPR044778) e não apresentar similaridade significativa com transcritos de *J. curcas* do RefSeq.

A família MIP (*Major Intrinsic Protein*) inclui membros denominados aquaporinas, proteínas de canal que facilitam o transporte de água e/ou pequenos

solutos neutros, desempenhando um papel relevante nas relações hídricas das plantas (KAPILAN; VAZARI; ZWIAZEK., 2018). As aquaporinas também desempenham um papel no estresse oxidativo. Aquaporinas diferencialmente expressas em plantas sob condições salinas foram associadas a melhor absorção de água pelas raízes, redução da perda de água durante o estágio inicial do estresse e manutenção do balanço hídrico (QIN et al., 2019; ZHANG et al., 2014). Plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando o transgene de aquaporina (MsPIP2; 2 de *Medicago sativa*) exibiram tolerância à salinidade, devido ao aumento do conteúdo de prolina e diminuição dos níveis de ROS (LI et al., 2019). Além disso, as plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando aquaporina sob estresse salino tiveram um aumento da expressão das enzimas antioxidantes, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR) e ascorbato peroxidase (APX) (ALAVILLI et al., 2016; LIU et al., 2019).

A indução das aquaporinas já foi relatada em *J. curcas* após duas horas de exposição a NaCl 100 mM (ZHANG et al., 2014). Além disso, a expressão heteróloga de aquaporinas isoladas de *J. curcas* melhorou o crescimento da raiz e o rendimento de sementes de plantas transgênicas de *A. thaliana* sob estresse salino (NaCl 150 mM) (KHAN et al., 2015). A modulação positiva dos membros da família MIP foi expressiva no perfil de resposta ao sal do acesso Jc171 (Figura 2A), e quatro candidatos apresentaram sua expressão validada pelo ensaio RT-qPCR (Tabela 1). Portanto, a superexpressão de aquaporinas em acessos de *J. curcas* pode representar uma estratégia para melhorar os mecanismos de defesa antioxidante na resposta ao sal.

Considerando o conjunto de PTM putativos induzidos, como os genes de *J. curcas* a serem regulados por FTs, a análise de enriquecimento de FT destacou os membros da família TCP interagindo exclusivamente com regiões promotoras de genes induzidos associados a PTM (Tabela S4). A família TCP compreende FTs específicos de plantas, cujas ações refletem no desenvolvimento e nas respostas ao estresse biótico/abiótico (MA et al., 2016; HUO et al., 2019). A indução de FTs da família TCP em cultivar tolerante ao feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) foi associada a um melhor ajuste osmótico nas raízes após exposição a NaCl 150 mM (ILHAN; BÜYÜK; INAL, 2018). Além disso, membro da família TCP teve sua expressão aumentada na resposta inicial (30 min. - 6 h) de *Panicum virgatum* L. a NaCl 250 mM (HUO et al., 2019). Adicionalmente, FTs induzidos da família TCP foram detectados

apenas na cultivar de arroz tolerante ao sal, regulando transportadores de membrana, em plantas após (30 min. - 4 h) exposição a NaCl 200 mM (ALMEIDA et al., 2017). Assim, FTs da família TCP podem ser bons candidatos em eventos transgênicos, visando melhorar a tolerância da planta à salinidade.

Além disso, os FTs das famílias ERF e NAC também desempenham papéis na resposta ao sal a nível transcricional, uma vez que potencialmente regulam os genes que codificam PTM e outros genes responsivos ao estresse (AMIN et al., 2021). Plantas transgênicas de choupo (*Populus alba* × *Populus glandulosa*) com superexpressão do gene ERF38 assim como plantas transgênicas de *A. thaliana* com superexpressão do gene EFR12, melhoraram a tolerância à salinidade, associada a maior estabilidade estrutural das membranas e redução do acúmulo de ROS (CHENG et al., 2019; HAN et al., 2021). Por sua vez, as plantas transgênicas de *A. thaliana* com superexpressão do transgene NAC (FT) apresentaram melhor potencial osmótico direcionando água para as células e melhor extrusão do íon sódio, melhorando a tolerância da planta ao sal (MAO et al., 2014). Membros dessas famílias de FTs também são bons candidatos em eventos transgênicos, pois podem potencializar as respostas de tolerância à salinidade.

Este estudo representa o primeiro transportoma considerando PTM codificados por transcritos de RNA-Seq de raízes de *J. curcas* após três horas de exposição a NaCl 150 mM. Nós identificamos transcritos que codificam PTM com destaque os membros das seguintes famílias: F-ATPase, MC, ABC, MFS e MIP. As F-ATPases destacaram o sequestro de Na<sup>+</sup> vacuolar e a redução do estresse oxidativo. Os transportadores mitocondriais (família MC) minimizam o estresse oxidativo pela redução do ROS mitocondrial. Os transportadores ABC destacaram a absorção de íons potássio (K) e a homeostase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. Por sua vez, os transportadores de açúcar (família MFS) reforçaram o ajuste osmótico, a reabsorção de monossacarídeos e a estabilidade estrutural da membrana, enquanto as aquaporinas (família MIP) reforçaram o acúmulo de prolina, a redução de ROS e o aumento de enzimas antioxidantes. Além disso, dois DEGs (das famílias MFS e F-ATPase) podem representar novas sequências, uma vez que não apresentaram semelhanças significativas com sequências de *J. curcas* do RefSeq (NCBI, maio de 2021), mas mostraram os domínios proteicos esperados.

Por fim, membros FTs das famílias TCP, ERF e NAC são propostos como transgenes com base em suas interações exclusivas com promotores de genes que

codificam PTM induzidos. Cabe ainda destacar que Jc171 é considerado um acesso sensível ao sal quando comparado com o acesso Jc183, entretanto Jc171 é moderadamente tolerante ao sal em comparação com outros acessos de *J. curcas* (LOZANO-ISLA et al., 2018). Assim, o transportoma de Jc171 e os DEGs que codificam PTM identificados aqui compreendem dados úteis aos programas de melhoramento de *J. curcas*, especialmente visando a obtenção de materiais elite tolerantes ao sal.

## Referências

- ADEM, G. D. et al. Expressing *Arabidopsis thaliana* V-ATPase subunit C in barley (*Hordeum vulgare*) improves plant performance under saline condition by enabling better osmotic adjustment. **Functional Plant Biology**, v. 44, n. 12, p. 1147-1159, 2017. <https://doi.org/10.1071/FP17133>
- ALMEIDA, D. M. et al. Five novel transcription factors as potential regulators of OsNHX1 gene expression in a salt tolerant rice genotype. **Plant Molecular Biology**, v. 93, n. 1-2, p. 61-77, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0547-7>
- AMIN, I. et al. Ion homeostasis for salinity tolerance in plants: a molecular approach. **Physiologia Plantarum**, v. 171, n. 4, p. 578-594, 2021. <https://doi.org/10.1111/ppl.13185>
- AMIRBAKHTIAR, N. et al. Transcriptome response of roots to salt stress in a salinity-tolerant bread wheat cultivar. **PloS one**, v. 14, n. 3, p. e0213305, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213305>
- BEGCY, K. et al. An *Arabidopsis* mitochondrial uncoupling protein confers tolerance to drought and salt stress in transgenic tobacco plants. **PloS one**, v. 6, n. 8, 2011. <https://doi.org/10.3390/ijms20102389>
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- BUSHMANOVA, E. et al. rnaQUAST: a quality assessment tool for de novo transcriptome assemblies. **Bioinformatics**, v. 32, n. 14, p. 2210-2212, 2016. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw218>
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.1127972009>.
- CABRAL, G. A. L. et al. First Expressed TFome of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) After Salt Stimulus. **Plant Molecular Biology Reporter**, p. 1-20, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11105-019-01187-w>
- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant molecular biology reporter**, v. 11, n. 2, p. 113-116, 1993. <https://doi.org/10.1007/BF02670468>
- CHE-OTHMAN, M. H.; MILLAR, A. H.; TAYLOR, N. L. Connecting salt stress signalling pathways with salinity-induced changes in mitochondrial metabolic processes in C3 plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 40, n. 12, p. 2875-2905, 2017. <https://doi.org/10.1111/pce.13034>
- CHENG, Z. et al. Over-expression of ERF38 gene enhances salt and osmotic tolerance in transgenic poplar. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 1375, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01375>

- FENG, Y. et al. Effects of exogenous trehalose on the metabolism of sugar and abscisic acid in tomato seedlings under salt stress. **Transactions of Tianjin University**, v. 25, n. 5, p. 451-471, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12209-019-00214-x>
- FORMENTIN, E. et al. Transcriptome and cell physiological analyses in different rice cultivars provide new insights into adaptive and salinity stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 204, 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00204>
- GRABHERR, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644, 2011. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- GUO, Q. et al. Overexpression of a samphire high-affinity potassium transporter gene SbHKT1 enhances salt tolerance in transgenic cotton. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 3, p. 1-8, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-3027-2>
- HAN, D. et al. Overexpression of MbERF12, an ERF gene from *Malus baccata* (L.) Borkh, increases cold and salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* associated with ROS scavenging through ethylene signal transduction. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10199-9>
- HE, X. et al. Wheat V-H<sup>+</sup>-ATPase subunit genes significantly affect salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 9, n. 1, 2014. [doi:10.1371/journal.pone.0086982.g001](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086982.g001)
- HUO, Y. et al. Genome-wide analysis of the TCP gene family in Switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **International Journal of Genomics**, v. 2019, p. 1-14, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8514928>
- İLHAN, E.; BÜYÜK, İ.; İNAL, B. Transcriptome–Scale characterization of salt responsive bean TCP transcription factors. **Gene**, v. 642, p. 64-73, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.11.021>
- JAN, A. U. et al. Potassium and zinc increase tolerance to salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 116, p. 139-149, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.05.008>
- JIA, F. et al. Overexpression of mitochondrial phosphate transporter 3 severely hampers plant development through regulating mitochondrial function in *Arabidopsis*. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129717, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129717>
- JIN, J. et al. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. **Nucleic acids research**, v. 45, p. gkw982, 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw982>

JULIUS, B. T. et al. Sugar transporters in plants: new insights and discoveries. **Plant and Cell Physiology**, v. 58, n. 9, p. 1442-1460, 2017.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcx090>

KAMEL, D. A. et al. Smart utilization of jatropha (*Jatropha curcas* Linnaeus) seeds for biodiesel production: Optimization and mechanism. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 407-413, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.029>

KAPILAN, R.; VAZIRI, M.; ZWIAZEK, J. J. Regulation of aquaporins in plants under stress. **Biological Research**, v. 51, n. 1, p. 4, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0152-0>

KHAN, M. S.; AHMAD, D.; KHAN, M. A. Utilization of genes encoding osmoprotectants in transgenic plants for enhanced abiotic stress tolerance. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 257-266, 2015.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.04.002>

KHAN, K. et al. Heterologous expression of two *Jatropha* aquaporins imparts drought and salt tolerance and improves seed viability in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0128866, 2015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0128866>

KIM, Do-Young et al. Overexpression of AtABCG36 improves drought and salt stress resistance in *Arabidopsis*. **Physiologia plantarum**, v. 139, n. 2, p. 170-180, 2010.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2010.01353.x>

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 323, 2011.  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/12/323>

LI, S. et al. MsPIP2; 2, a novel aquaporin gene from *Medicago sativa*, confers salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 165, p. 39-52, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.05.020>

LIANG, W. et al. Plant salt-tolerance mechanism: A review. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, n. 1, p. 286-291, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.043>

LIU, H. et al. Gene-Wide Analysis of Aquaporin Gene Family in *Malus domestica* and Heterologous Expression of the Gene MpPIP2; 1 Confers Drought and Salinity Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 15, p. 3710, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20153710>

LIU, Q. et al. Genome-wide identification, expression, and functional analysis of the sugar transporter gene family in Cassava (*Manihot esculenta*). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 987, 2018.  
<https://doi.org/10.3390/ijms19040987>

- LOPEZ-ORTIZ, C. et al. Genome-wide identification and gene expression pattern of ABC transporter gene family in *Capsicum* spp. **PloS one**, v. 14, n. 4, p. e0215901, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215901>
- LOZANO-ISLA, F. et al. Effects of seed storage time and salt stress on the germination of *Jatropha curcas* L. **Industrial Crops and Products**, v. 118, p. 214-224, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.052>
- LV, S. et al. The V-ATPase subunit A is essential for salt tolerance through participating in vacuolar Na<sup>+</sup> compartmentalization in *Salicornia europaea*. **Planta**, v. 246, n. 6, p. 1177-1187, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2762-0>
- MA, X. et al. Genome-wide identification of TCP family transcription factors from *Populus euphratica* and their involvement in leaf shape regulation. **Scientific Reports**, v. 6, p. 32795, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep32795>
- MANSURI, R. M. et al. Dissecting molecular mechanisms underlying salt tolerance in rice: a comparative transcriptional profiling of the contrasting genotypes. **Rice**, v. 12, n. 1, p. 13, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0273-2>
- MAO, X. et al. Novel NAC transcription factor TaNAC67 confers enhanced multi-abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e84359, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084359>
- MBARKI, S. et al. Strategies to Mitigate the Salt Stress Effects on Photosynthetic Apparatus and Productivity of Crop Plants. In: **Salinity Responses and Tolerance in Plants**, v. 1. Springer, Cham, 2018. p. 85-136. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-75671-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75671-4_4)
- MONFARED, H. H. et al. Overexpression of a rice monosaccharide transporter gene (OsMST6) confers enhanced tolerance to drought and salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 38, n. 1, p. 151-164, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11105-019-01186-x>
- NEGRÃO, S.; SCHMÖCKEL, S. M.; TESTER, M. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. **Annals of Botany**, v. 119, n. 1, p. 1-11, 2017. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw191>
- OFORI, P. A. et al. Genome-wide analysis of ATP binding cassette (ABC) transporters in tomato. **PloS one**, v. 13, n. 7, p. e0200854, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200854>
- OLIVEIRA, L. F. **Estudo de expressão gênica em pau-ferro: estratégias otimizadas para a detecção e análise de genes associados com tolerância à seca**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Piauí.
- PARIHAR, P. et al. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4056-4075, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3739-1>

- PECINA-QUINTERO, V. et al. Genetic structure of *Jatropha curcas* L. in Mexico and probable centre of origin. **Biomass and Bioenergy**, v. 60, p. 147-155, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.11.005>
- PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36-e36, 2002. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- QIN, S. et al. Aquaporins and their function in root water transport under salt stress conditions in *Eutrema salsugineum*. **Plant Science**, v. 287, p. 110199, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110199>
- REN, Q.; KANG, K. H.; PAULSEN, I. T. TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 1, p. D284-D288, 2004. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh016>
- ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- SANTOS, L. S. et al. Salinity shock in *Jatropha curcas* leaves is more pronounced during recovery than during stress time. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 8, p. 11611-11633, 2019. <https://doi.org/10.1101/378208>
- SENADHEERA, P.; SINGH, R. K.; MAATHUIS, F. J. M. Differentially expressed membrane transporters in rice roots may contribute to cultivar dependent salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 9, p. 2553-2563, 2009. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp099>
- SHABALA, S. et al. On a quest for stress tolerance genes: membrane transporters in sensing and adapting to hostile soils. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 4, p. 1015-1031, 2016. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv465>
- SHINDE, H. et al. Comparative de novo transcriptomic profiling of the salinity stress responsiveness in contrasting pearl millet lines. **Environmental and Experimental Botany**, v. 155, p. 619-627, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.07.008>
- SILVA, E. N. et al. Salt stress induced damages on the photosynthesis of physic nut young plants. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 1, p. 62-68, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162011000100010>
- SOUZA, M. C. P. et al. RNA-Seq transcriptome analysis of *Jatropha curcas* L. accessions after salt stimulus and unigene-derived microsatellite mining. **Industrial Crops and Products**, v. 147, p. 112168, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112168>
- UNTERGASSER, A. et al. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 15, p. e115-e115, 2012. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>

VISHWAKARMA, K. et al. Avenues of the membrane transport system in adaptation of plants to abiotic stresses. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 7, p. 861-883, 2019. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1616669>

VITA, F. et al. Early responses to salt stress in quinoa genotypes with opposite behavior. **Physiologia Plantarum**, p. 1-29, 2021. <https://doi.org/10.1111/ppl.13425>

WANG, F. et al. Overexpression of vacuolar proton pump ATPase (V-H<sup>+</sup>-ATPase) subunits B, C and H confers tolerance to salt and saline-alkali stresses in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 10, p. 2279-2289, 2016. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61399-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61399-0)

WANG, L. et al. Improving salt tolerance in potato through overexpression of AtHKT1 gene. **BMC plant biology**, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1963-z>

WANG, P. et al. Genome-Wide Screening and Characterization of the Dof Gene Family in Physic Nut (*Jatropha curcas* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1-15, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19061598>

WANG, P. et al. Vacuolar membrane H<sup>+</sup>-ATPase c<sup>+</sup> subunit gene (ThVHAc<sup>+</sup>1) from *Tamarix hispida* Willd improves salt stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 157, p. 370-378, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.10.039>

YAMADA, K. et al. Monosaccharide absorption activity of *Arabidopsis* roots depends on expression profiles of transporter genes under high salinity conditions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 50, p. 43577-43586, 2011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.269712>

ZHANG, L. et al. Global analysis of gene expression profiles in physic nut (*Jatropha curcas* L.) seedlings exposed to salt stress. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e97878, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097878>

ZHOU, A. et al. A novel sugar transporter from *Dianthus spiculifolius*, DsSWEET12, affects sugar metabolism and confers osmotic and oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 497, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19020497>

## 4.2 ARTIGO 2

### **Identificação e Caracterização de Aquaporinas em transcriptoma de *Jatropha curcas* submetida à exposição salina (150 mM NaCl)**

**Resumo** - O pinhão manso (*Jatropha curcas*), oleaginosa com grande potencial para a produção de biocombustíveis em regiões áridas, é considerado tolerante à seca e sensível à salinidade. Uma classe de proteínas que desempenha papel importante no transporte de água e, conseqüentemente, está associada à tolerância à salinidade em plantas, são as aquaporinas (AQPs). Assim, caracterizamos e analisamos a expressão das JcAQPs em transcriptoma de raízes de acessos contrastante *J. curcas* (Jc171 e Jc183) submetida à salinidade (3h; 150 mM NaCl) via RNA-Seq. Sequências proteicas de AQPs de *Arabidopsis thaliana* (39) e *J. curcas* (36) obtidas, respectivamente, do banco de dados TransportDB e NCBI, foram utilizadas para minerar as AQPs no transcriptoma de *J. curcas*. Um conjunto de 59 transcritos codificadores de JcAQPs foi identificado via BLASTx ( $e\text{-value} \leq 10^{-10}$ ). Apesar da confirmação de domínio (PF00230), vários transcritos incompletos (35) foram descartados e as análises de caracterização envolveram um total de 24 JcAQPs completas. De acordo com a análise filogenética, as JcAQPs expressas foram classificadas em quatro subfamílias: NIP (*NOD26-like Intrinsic Proteins* - 06), PIP (*Plasma Membrane Intrinsic Proteins* - 05), SIP (*Small Basic Intrinsic Proteins* - 04) e TIP (*Tonoplast Intrinsic Proteins* - 09). A análise da estrutura éxon-ínton (GSDS) e de motivos conservados (MEME) permitiram identificar padrões específicos para cada subfamília. A identificação das regiões conservadas NPA, filtro de seletividade ar/R, posições de Froger e SDPs permitiram determinar diferenças na especificação do substrato entre as subfamílias das JcAQPs. A análise da expressão das JcAQPs foi bastante contrastante entre os dois acessos analisados. Jc171 apresentou 22 unigenes induzidos ( $p\text{-value} \leq 0,0001$ , FDR  $\leq 0,005$ , Log2 FC  $\geq 1$  - UR) em resposta ao sal, enquanto não houve modulação transcricional em Jc183 provavelmente porque esse genótipo tolera doses mais elevadas de sal do que a aplicada. As principais subfamílias com unigenes induzidos pelo acesso Jc171 foram PIP e TIP, representando um mecanismo de controle dos danos do estresse osmótico e oxidativo provocados pelo NaCl. Esses resultados demonstram a atuação das JcAQPs como mecanismo molecular na resposta à salinidade em pinhão manso, representando informações valiosas aos programas de melhoramento desta espécie.

**Palavras-chave:** estresse abiótico, pinhão manso, RNA-Seq

## Introdução

A salinização dos solos é um dos principais estresses abióticos a afetar a produtividade das culturas em todo o mundo. A alta concentração de sais no solo leva à uma perda de água pelas raízes e, conseqüentemente, impacta negativamente vários processos fisiológicos. Logo, proteínas envolvidas no transporte de água, como as aquaporinas, têm papel crucial na resposta adaptativa ao estresse salino (MCGAUGHEY et al., 2018).

As aquaporinas (AQPs) são proteínas de canal que facilitam o transporte bidirecional seletivo e passivo de água, pequenos solutos neutros, gases e íons metálicos através das membranas (AFZAL et al., 2016; MCGAUGHEY et al., 2018). É importante destacar que as aquaporinas não atuam apenas nas relações hídricas das plantas, mas também no transporte de nutrientes, tais como amônia, uréia, boro, silício e sódio; bem como no desenvolvimento vegetal e sinalização a estresses (CHAUMONT; TYERMAN, 2017).

As AQPs constituem uma superfamília proteica altamente conservada, denominada MIP (*Major Intrinsic Proteins*), presente em arqueas, bactérias e eucariotos (FINN; CERDA, 2015). Análises envolvendo algas, musgos, licófitas, monocotiledôneas e eudicotiledôneas já identificaram 8 subfamílias de AQPs, nominalmente: PIPs (*Plasma Membrane Intrinsic Proteins*), NIPs (*NOD26-like Intrinsic Proteins*), TIPs (*Tonoplast Intrinsic Proteins*), SIPs (*Small Basic Intrinsic Proteins*), XIPs (*Uncharacterized Intrinsic Proteins*), GIPs (*GlpF-like Intrinsic Proteins*), HIPs (*Hybrid Intrinsic Proteins*) e LIPs (*Large Intrinsic Proteins*) (HUSSAIN et al., 2020).

Estudos genômicos revelam que as três subfamílias mais comuns em plantas superiores são PIP, TIP e NIP. SIP e XIP foram identificadas posteriormente e não são encontradas em monocotiledôneas e em plantas da família Brassicaceae. As subfamílias GIP, HIP e IIP são encontradas em musgos; além disso a subfamília HIP foi relatada em licófitas e GIP em algas (MAUREL et al., 2015; HUSSAIN et al., 2020).

As APQs estão localizadas em membranas biológicas e tipicamente apresentam seis hélices transmembranares conectadas por cinco *loops*, além de apresentarem regiões conservadas, como os motivos de Asn-Pro-Ala (NPA), filtro de seletividade Arginina/Aromática (ar/R) e os cinco aminoácidos coletivamente conhecidos como as posições de Froger (HOVE; BHAVE, 2011; POMMERENIG et

al., 2020), envolvidas na seletividade do canal. As AQPs são bastante representativas em plantas, sendo 35 genes identificados em *Arabidopsis thaliana* (AtAQPs) (JOHANSON et al., 2001). Na família Euphorbiaceae temos 37 genes AQPs identificados em *Ricinus communis* L. (RcAQP) (ZOU et al., 2015a); 45 em *Manihot esculenta* Crantz (MeAQP) (PUTPEERAWIT et al., 2017) e 51 em *Hevea brasiliensis* Muell.Arg. (HbAQP) (ZOU et al., 2015b); enquanto, com menor número, *Jatropha curcas* L. possui 32 genes AQPs identificados em seu genoma (ZOU et al., 2016).

*J. curcas*, conhecida popularmente como pinhão-mansão, é uma planta perene de crescimento rápido, cujo processo de frutificação ocorre um ano após o plantio (JONAS; KETLOGETSWE; GANDURE, 2020). O pinhão-mansão é uma espécie não comestível que se destaca por conter alto teor de óleo (40-50%) nas sementes e adaptação a regiões áridas e semi-áridas, tornando-a uma planta com grande potencial para a produção de biodiesel nessas regiões (WANG et al., 2018; TANG et al., 2020).

Um dos principais fatores limitantes do cultivo do pinhão-mansão em regiões áridas é a salinização dos solos. Nessa espécie, já existe estudo de caracterização genômica das AQPs (ZOU et al., 2016; ZHANG et al., 2014). Entretanto, ainda é pouco explorado a atuação das AQPs na resposta molecular de *J. curcas* à salinidade. Portanto, considerando a importância das AQPs na tolerância a estresses abióticos, esse trabalho propõe a caracterização e análise da expressão de AQPs em transcriptomas de raízes de acessos contrastantes (tolerante e sensível) de pinhão manso submetidos a exposição salina (150 mM NaCl, 3h).

## **Metodologia**

### **Origem dos dados de RNA-Seq e montagem do transcriptoma**

O ensaio de RNA-Seq foi relatado pela primeira vez por Souza et al. (2020) e Cabral et al. (2020). Foram utilizados dois acessos brasileiros, previamente relatados quanto às suas respostas ao NaCl como tolerante ao sal Jc183 (Embrapa Agroenergia) e o moderadamente tolerante Jc171 (UFAL/CECA, Alagoas) (LOZANO-ISLA et al., 2018), aqui referido como sensível ao sal. Em resumo, o ensaio de NaCl forneceu 12 bibliotecas de RNA-Seq, de acordo com a distribuição em um delineamento inteiramente casualizado, dois tratamentos (sem sal ou três horas de exposição a NaCl 150 mM) e três plantas meia-irmã de cada acesso. Após

o tratamento com NaCl, as raízes foram coletadas, imediatamente congeladas (nitrogênio líquido) e mantidas a -80 °C até a extração do RNA total (kit SV Total RNA Isolation System, Promega). Amostras de RNA mostrando qualidade (razões A260/280 e A230/280 próximo de 2,0), quantidade (equipamento Nanodrop) e integridade (integridade RIN  $\geq 9$ , Agilent Bioanalyzer 6000) forneceram as 12 bibliotecas de RNA-Seq, que foram geradas e sequenciado (2 x 100 bp *par-end-reads*) usando a plataforma Illumina HiSeq2500 da ESALQ Genomic Core Facility (Piracicaba - SP, Brasil).

A montagem do transcriptoma também é descrita em Souza et al. (2020) e Cabral et al. (2020). Resumidamente, os dados brutos foram analisados quanto à qualidade (FastQC; <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) antes e depois da filtragem inicial realizada no Trimmomatic (v.0.36; BOLGER et al., 2014) para remover *reads* e adaptadores de baixa qualidade. Apenas pares de *reads* de alta qualidade (*Phred*  $\geq 30$ , para todas as bases) foram usados para montar o transcriptoma *De novo* com o programa Trinity 2.2.0 (GRABHERR et al., 2011). A abundância dos transcritos expressos em cada biblioteca foi normalizada por *fragments per kilobase per million mapped reads* (FPKM) usando o software RSEM (LI; DEWEY, 2011). A qualidade do transcriptoma *De novo* foi avaliada pelo software rnaQUAST-1.5.2 (BUSHMANOVA et al., 2016) usando o genoma de referência Jatcur 1.0 (GenBank, acesso GCA\_00696525.1) e parâmetros padrão.

### **Identificação de transcritos codificadores de aquaporinas em *J. curcas***

Sequências proteicas de AQPs de *A. thaliana* (39) e *J. curcas* (36) foram obtidas, respectivamente, do banco de dados TransportDB (<http://www.membranetransport.org/transportDB2/index.html>), para "The Major Intrinsic Protein (MIP) Family" e NCBI (GCF\_000696525.1\_JatCur\_1.0\_protein) para "aquaporin". Esses conjuntos proteicos foram utilizados para minerar as AQPs no transcriptoma de *J. curcas*, via similaridades em análise BLASTx (*e-value*  $\leq 10^{-10}$ ). Deste modo, se elegeu o melhor *hit* para cada transcrito, considerando os seguintes parâmetros: menor *e-value*, maior identidade, maior tamanho e maior *score*. Os possíveis transcritos codificadores de AQPs em *J. curcas* foram traduzidos *in silico* no programa BioEdit (HALL et al., 1999) (tamanho mínimo da ORF – 10 aminoácidos) e, posteriormente, analisados quanto ao domínio MIP (Pfam PF00230) na ferramenta Hmmer (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) usando parâmetros padrão.

### **Análises das sequências de AQPs e propriedades proteicas**

Os transcritos identificados no transcriptoma de *J. curcas* anotados para AQP, com as sequências codificadoras (CDS) completas, tiveram as estruturas gênicas, éxons e íntrons, identificadas por meio da ferramenta online Gene Structure Display Server (GSDS 2.0) (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>).

A caracterização das sequências proteicas envolveu apenas aquelas obtidas da tradução de transcritos que possuíam CDS completas. As hélices transmembranas (TMHs) foram detectadas por meio do TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). O ponto isoelétrico (pI) e o peso molecular (MW) das JcAQPs candidatas foram calculados via ExPASy ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)). Localizações subcelulares foram previstas usando o software WoLF PSORT ([wolfpsort.hgc.jp/](http://wolfpsort.hgc.jp/)) e DeepLoc-1.0 (ARMENTEROS et al., 2017). Os potenciais genes ortólogos das prováveis proteínas JcAQPs em *A. thaliana* foram previstos pelo OrthoVenn2 (XU et al., 2019).

Os motivos conservados NPA, os filtros de seletividade ar/R, as posições de Froger e as SDPs (Posições determinantes de especificidade) foram determinados por uma inspeção visual cuidadosa a partir do alinhamento múltiplo das JcAQPs no Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), comparando-as com outras AQPs caracterizadas funcional e estruturalmente conforme relatado por Hove e Bhave (2011) e Zou et al. (2016).

### **Análise filogenética e distribuição dos motivos conservados**

Alinhamento múltiplo das sequências proteicas de AtAQPs (*Arabidopsis thaliana* AQPs, 32), MeAQPs (*M. esculenta*, 29) e JcAQPs (identificadas nesse trabalho) foi realizado via software MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>). A árvore foi construída pelo método de Máxima Verossimilhança com 10000 repetições de ultrafast bootstrap por meio do software IQTREE (TRIFINOPOULOS et al., 2016). Os motivos conservados das JcAQPs foram identificados usando o software MEME (<http://meme-suite.org/>).

### **Análise da expressão diferencial *in silico* em resposta a NaCl (150 mM)**

Unigenes diferencialmente expressos (DEGs) foram identificados usando o pacote edgeR (Robinson et al., 2010). Unigenes com valores Log<sub>2</sub>FoldChange (Log<sub>2</sub>FC) ≥ 1 (modulação positiva ou indução, UR) ou ≤ -1 (modulação negativa ou

repressão, DR),  $p\text{-value} \leq 0,0001$  e taxa de falsa descoberta (FDR)  $\leq 0,005$  foram considerados DEGs.

### **Validação da expressão gênica por RT-qPCR**

Os ensaios RT-qPCR permitiram validar a expressão *in silico* dos unigenes e verificar a confiabilidade dos dados de RNA-Seq. Treze candidatos *JcAQP*s (três subfamílias) foram selecionados para os ensaios RT-qPCR com base na expressão *in silico*. Os *primers* foram desenhados com a ferramenta Primer3 (UNTERGASSER et al., 2012), aplicando-se os seguintes parâmetros: tamanho do amplicon - 80 a 150 bp; temperatura de desnaturação - 58 °C (mínimo), 60 °C (ótimo) e 62 °C (máximo), e conteúdo de GC - 45 a 55% (Tabela S1).

Os RNAs foram extraídos das raízes de *J. curcas* usando um protocolo híbrido modificado (CTAB / coluna de sílica Quiagen) (CHANG et al., 1993; OLIVEIRA, 2018), e os cDNAs foram obtidos usando o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega Corp., EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação quantitativa dos genes em tempo real foi realizada usando o sistema de detecção SYBR Green (Go Taq qPCR Master Mix - Promega) no termociclador LineGene 9600 (Bioer, Hangzhou, China). As reações de RT-qPCR incluíram três plantas meia-irmãs do acesso Jc171, simulando triplicatas biológicas, triplicatas técnicas, controle negativo e dois genes de referência - actina e  $\beta$ -tubulina (SOUZA et al., 2020; CABRAL et al., 2020), relatado anteriormente usando os mesmos dados de RNA-Seq. As reações ocorreram conforme a programação: desnaturação inicial – 95°C por 2min, 40 ciclos – 95°C por 15 segundos seguido de 60°/1min. Após a ciclagem, para obter a curva de dissociação, os amplicons foram submetidos a 65°C e 95°C durante 20 minutos

Os valores Cq e as quantificações absolutas e relativas foram obtidos pelo software LineGene (v.1.1.10). Os dados de expressão relativa consideraram um teste de randomização com 10.000 permutações e um teste de hipótese para verificar diferenças significativas entre os grupos de controle e tratamento no programa REST (Relative Expression Software Tool v.2.0.13; PFAFFL et al., 2002).

## Resultados

### Identificação e caracterização de potenciais *JcAQP*s expressas em resposta a NaCl (150 mM)

Um conjunto de 59 transcritos potencialmente codificadores de AQP<sub>s</sub> foi identificado no transcriptoma de *J. curcas* via BLASTx ( $e\text{-value} \leq 10^{-10}$ ). A tradução desses transcritos permitiu confirmar os potenciais produtos proteicos como sendo da família MIP, após identificação do domínio correspondente (Pfam PF00230). Um total de 35 sequências proteicas obtidas da tradução de transcritos que possuíam CDS incompletas foram descartadas das análises de caracterização. Dessa forma, 24 *JcAQP*s com sequências proteicas completas foram caracterizadas (Tabela 1).

As 24 *JcAQP*s pertenceram a quatro subfamílias, NIP (06), PIP (05), SIP (04) e TIP (09). NIP e PIP apresentaram características semelhantes em relação ao tamanho, ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (MW) (Tabela 1). Os valores médios para essas subfamílias foram: 278 e 286 aa, pI 8,4 e 8,3 e MW 29373,6 e 30502,4 Da, respectivamente. Os representantes da subfamília SIP apresentam os maiores valores de pI (média 9,7), enquanto TIP possui os menores (pI médio – 5,9). De modo geral, o tamanho das *JcAQP*s variou de 222 (*JcNIP4;1*) a 316 aa (*JcNIP4;2*). O peso molecular oscilou entre 23925,22 (*JcNIP4;1*) a 34114,18 Da (*JcNIP4;2*), enquanto o ponto isoelétrico foi de 4,96 (*JcTIP1;3*) a 10,02 (*JcSIP1;1*). A maioria das *JcAQP*s (17), aproximadamente 70%, apresentaram seis domínios transmembranares (TMHs), enquanto 07 proteínas apresentaram apenas cinco TMHs (Tabela 1).

Em relação à localização subcelular, as *JcAQP*s são encontradas principalmente na membrana plasmática e na membrana do vacúolo (Tabela 1). Isso ocorre preferencialmente nos membros das subfamílias PIP e TIP, respectivamente. A subfamília SIP além de ser encontrada na membrana plasmática, também apresentou localização em membrana de cloroplasto e do retículo endoplasmático. A análise de ortologia revelou que 58,33% das *JcAQP*s sendo ortólogas às AQP<sub>s</sub> de *A. thaliana* de quatro subfamílias: NIP (03), PIP (02), SIP (02) e TIP (07) (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização das Aquaporinas identificadas no transcriptoma de *J. curcas* expresso sob salinidade (150mM NaCl).

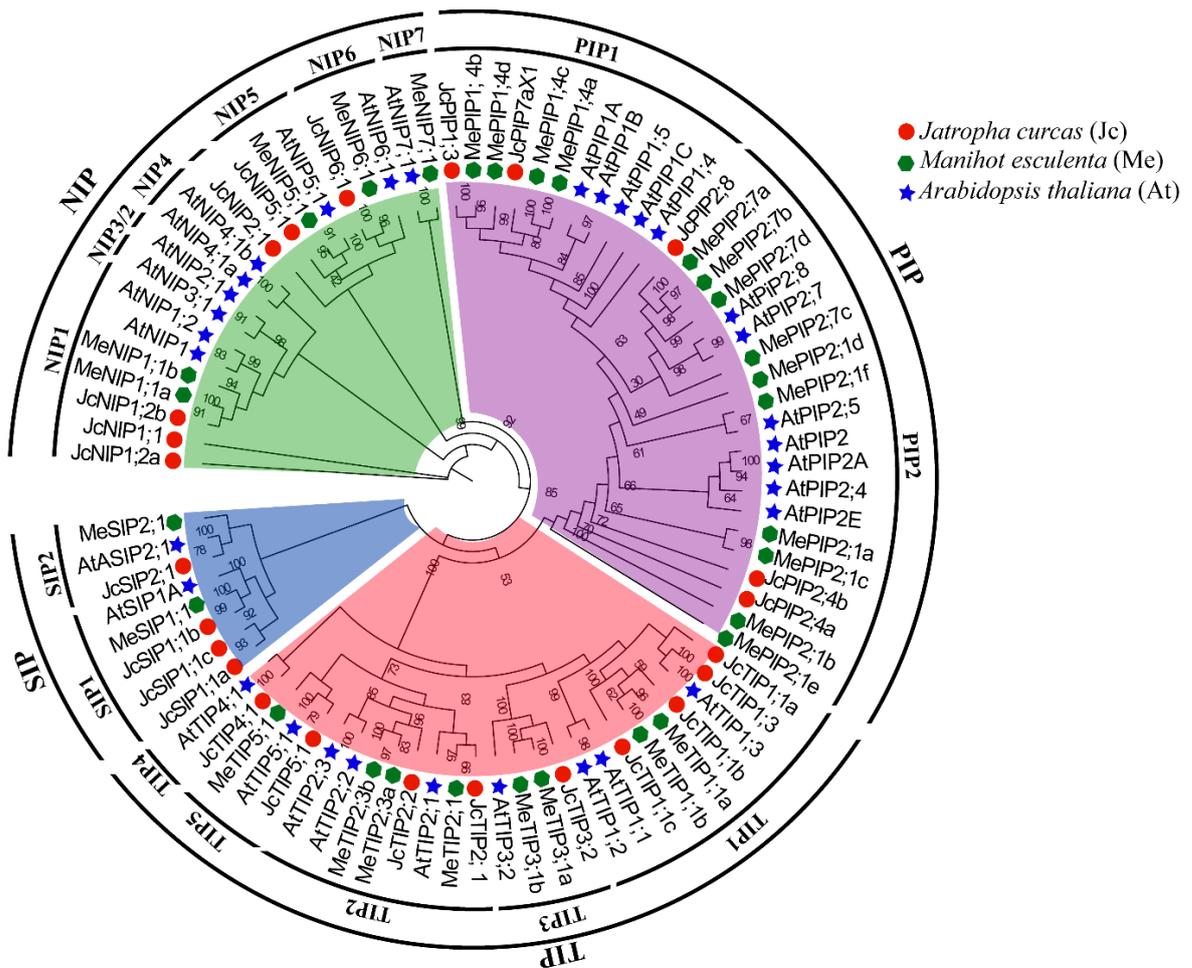
Nome	Gene ID (NCBI)	Tam. Transcrito (pb)	Frame	CDS (pb)	Tam (aa)	TMH	pl	MW(Da)	Loc1	Loc2	Ortólogo em <i>A. thaliana</i>
<i>JcNIP1;2a</i>	105630978	1015	3	834	277	6	8,5	30035,31	Plas	Lys/Vacu	
<i>JcNIP1;2b</i>	105649720	1239	1	828	275	6	9,21	29266,31	Plas	Plas	NIP1;2 (At4g18910)
<i>JcNIP2;1</i>	105644068	1562	3	876	291	6	8,85	30798,66	Plas/Vacu	Plas	
<i>JcNIP1;1</i>	105628020	871	1	669	222	5	6,26	23925,22	Vacu	Lys/Vacu	
<i>JcNIP5;1</i>	105645569	1699	-2	897	298	5	8,87	30847,73	Plas	Plas	NIP5;1 (At4g10380)
<i>JcNIP6;1</i>	105630327	1261	1	924	307	6	8,71	31368,49	Plas	Plas	NIP6;1 (At1g80760)
<i>JcPIP1;3</i>	105645794	993	-3	864	287	6	8,62	30542,41	Plas	Plas	PIP1C (At1g01620)
<i>JcPIP2;4a</i>	105628093	1389	-3	861	286	6	7,62	30595,46	Plas	Plas	
<i>JcPIP2;4b</i>	105642213	1268	-3	867	288	6	7,62	30737,66	Plas	Plas	
<i>JcPIP2;8</i>	105641801	1064	1	843	280	6	8,97	29905,95	Plas	Plas	PIP3 (At4g35100)
<i>JcPIP7aX1</i>	105646538	1405	1	864	287	5	8,6	30730,74	Plas	Plas	
<i>JcSIP1;1a</i>	105648170	1086	1	729	242	5	9,73	26013,09	Plas	Lys/Vacu	
<i>JcSIP1;1b</i>	105650423	1667	-3	720	239	5	9,58	25794,54	Plas	R.E.	SIP1A (At3g04090)
<i>JcSIP1;1c</i>	105648169	1133	2	732	243	5	10	25996,93	Chlo	Lys/Vacu	
<i>JcSIP2;1</i>	105640018	1362	2	726	241	5	9,57	26368,04	Cyto	Lys/Vacu	SIP2;1 (At3g56950)
<i>JcTIP1;1a</i>	105628209	1057	-1	759	252	6	5,13	25785,70	Vacu/Cyto	Lys/Vacu	
<i>JcTIP1;1b</i>	105642288	1134	1	759	252	6	5,91	25967,92	Vacu	Lys/Vacu	TIPγ (At2g36830)
<i>JcTIP1;1c</i>	105628007	1179	-2	765	254	6	5,83	26393,57	Plas	Lys/Vacu	
<i>JcTIP1;3</i>	105641584	1049	3	759	252	6	4,96	25791,79	Vacu/Cyto	Lys/Vacu	TIP1;3 (At4g01470)
<i>JcTIP2;1</i>	105635029	1009	-3	747	248	6	5,59	25257,34	Vacu/Cyto	Lys/Vacu	TIPδ (At3g16240)
<i>JcTIP2;2</i>	105632279	1031	-1	753	250	6	5,69	25341,46	Vacu	Lys/Vacu	TIP2;2 (At4g17340)
<i>JcTIP3;2</i>	105630176	1109	1	774	257	6	6,49	27335,97	Cyto	Lys/Vacu	TIPβ (At1g17810)
<i>JcTIP4;1</i>	105638238	1245	-2	744	247	6	6,12	25972,48	Cyto	Lys/Vacu	TIP4;1 (At2g25810)
<i>JcTIP5;1</i>	105648870	925	2	759	252	6	7,85	26008,22	Cyto	Lys/Vacu	TIP5;1 (At3g47440)

TMH – Hélice Transmembrana; pl – Ponto isoelétrico; MW – peso molecular; Loc 1 – Localização Subcelular WolfPsort; Loc 2 – Localização Subcelular DeepLoc; Plas – membrana plasmática; Vacu – vacúolo; Chlo – cloroplasto; Cyto – citoplasma; R.E. – Retículo Endoplasmático; Lys – Lisossomo.

## Análise filogenética e motivos conservados das *Jc*AQPs

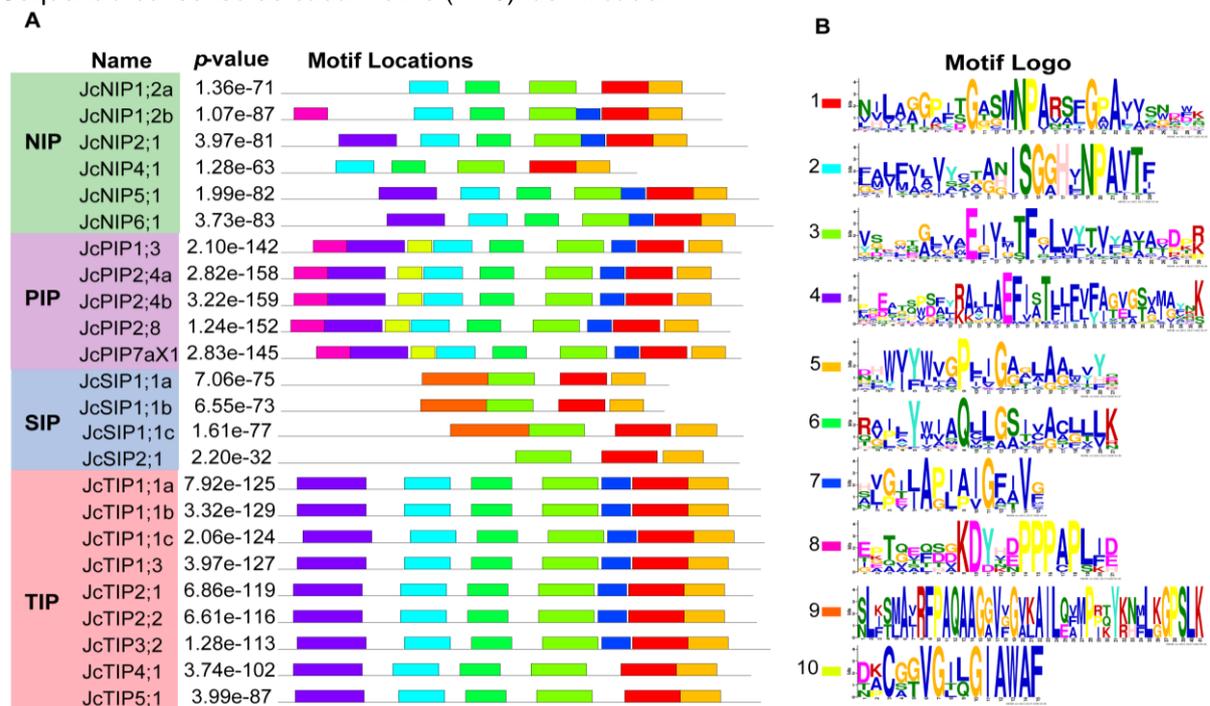
Para analisar a conservação e função putativa das 24 *Jc*AQPs expressas sob condição salina, uma árvore filogenética foi construída com AQPs da espécie modelo *A. thaliana* (32) e da euforbiácea mandioca (29 *Me*AQP). Foi possível perceber expressivas similaridades entre os elementos analisados, resultando na determinação de subgrupos proteicos. A subfamília TIP foi dividida em *Jc*PIP1 (2) e *Jc*PIP2 (3); TIP apresentou cinco subgrupos, *Jc*TIP1 (4), *Jc*TIP2 (2), *Jc*TIP3 (1), *Jc*TIP4 (1) e *Jc*TIP5 (1); SIP foi subdividida em *Jc*SIP1 (3) e *Jc*SIP2 (1); enquanto na subfamília NIP observou-se os subgrupos *Jc*NIP1 (3), *Jc*NIP2 (1), *Jc*NIP5 (1) e *Jc*NIP6 (1) (Figura 1, Tabela 1).

Figura 1. Análise filogenética de Aquaporinas de *A. thaliana* (At), *J. curcas* (Jc) e *M. esculenta* (Me). As seqüências proteicas foram alinhadas no MAFFT e a árvore foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança (10000 repetições de bootstrap) no IQTREE.



A partir da análise do MEME, identificou-se 10 motivos proteicos nas *JcAQP*s, bem como suas respectivas sequências-consenso (Figura 2- A, B). Os motivos 1, 3 e 5 foram comuns a todo o conjunto de *JcAQP*. Por outro lado, o motivo 9 foi identificado apenas na subfamília SIP, que apresentou o menor número (4) de motivos identificados (9, 3, 1 e 5). Os motivos 8 e 10 ocorreram predominantemente na família PIP, embora *JcNIP1;2b* apresentasse também o motivo 8. A subfamília TIP apresentou de modo característico sete motivos (4, 2, 6, 3, 7, 1 e 5), com exceção de *JcTIP4;1* e *JcTIP5;1* que não apresentaram o motivo 7 (Figura 2A). A subfamília NIP foi a que apresentou maior variação na distribuição dos motivos identificados.

Figura 2. Motivos conservados das 24 *JcAQP*s indentificadas no transcriptoma *J. curcas* expresso sob salinidade (150 mM NaCl). A - Os motivos estão numerados são exibidos em diferentes cores. B - Sequência consenso de cada motivo (1-10) identificado.

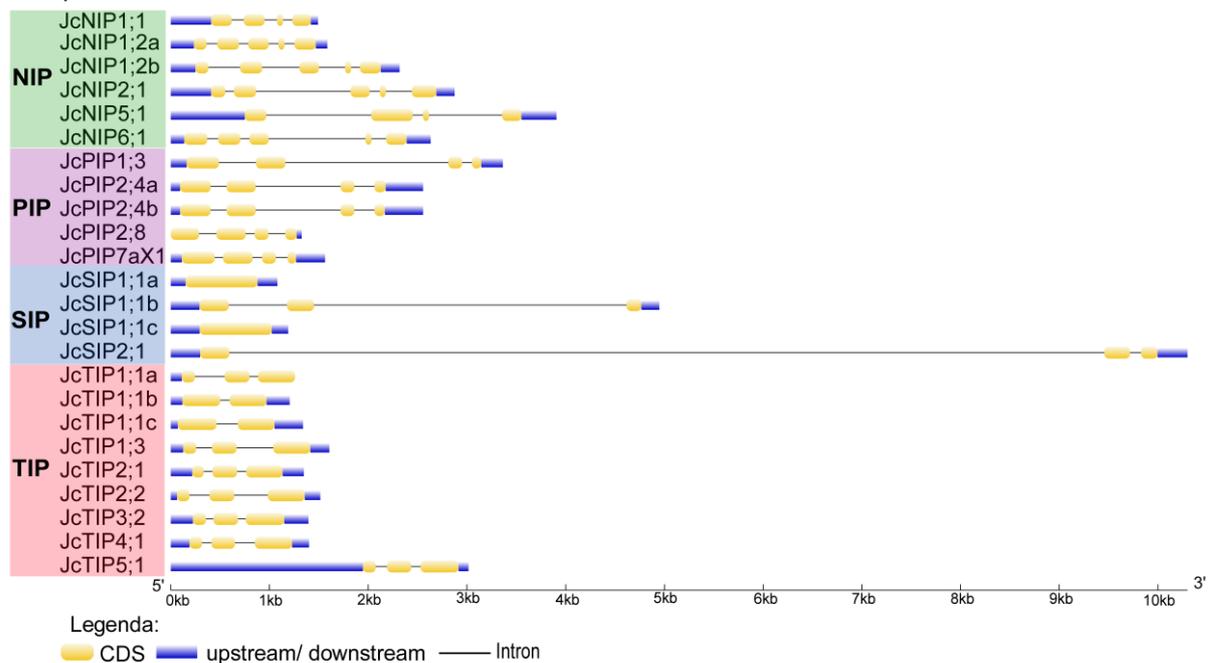


### Análise da estrutura exon-ínton das *JcAQP*s

A estrutura exon-ínton das 24 *JcAQP*s foi identificada via GSDS. O tamanho da CDS das *JcAQP*s variou de 669 a 924 pb, enquanto houve maior variação no tamanho de cada transcrito completo identificado (871 a 1699 pb) (Tabela 1). De modo geral, a maioria das *JcAQP*s expressas sob condições salinas apresentou dois (37,5%) ou três (29,2%) íntrons e três (37,5%) ou quatro (29,2%) exons (Figura 3).

As diferentes subfamílias de aquaporinas apresentam estruturas exon-íntron distintas. Em NIP, é predominante a presença de quatro íntrons, com exceção de *JcNIP5;1* e *JcNIP1;1* que possuem apenas três. Todas as PIP apresentaram caracteristicamente quatro éxons e três íntrons. As aquaporinas do tipo SIP apresentaram dois tipos de estrutura: sem íntrons e presença de apenas um exon longo (*JcSIP1;1a* e *JcSIP1;1c* – aprox. 0,8 kb); e, presença de três éxons e longos íntrons (*JcSIP1;1b* – aprox. 3 kb; *JcSIP2;1* – aprox. 8 kb). É comum entre as TIP a presença de três éxons (77,8%), embora *JcTIP1;1b* e *JcTIP1;1c* possuam apenas dois. Cabe ainda destacar que *JcTIP5;1* apresenta uma longa região 5'UTR (aprox. 2kb) (Figura 3).

Figura 3. Estrutura exon-íntron das 24 *JcAQP* indentificadas no transcriptoma *J. curcas* expresso sob salinidade (150 mM NaCl) via software GSDS. Bloco azul – regiões 5' e 3'UTR; bloco amarelo – exon; linha preta – íntron.



### Resíduos conservados em *JcAQPs* e inferência funcional

Os motivos NPA, o filtro de seletividade ar/R e as posições de Froger foram identificadas através do alinhamento múltiplo das 24 *JcAQPs* e aquaporinas vegetais já caracterizadas (Tabela 2). Ambos os domínios NPA foram conservados nas subfamílias TIP e PIP. Por outro lado, na subfamília NIP, o terceiro resíduo do primeiro domínio NPA apresentou uma serina, ao invés de alanina, em *JcNIP6;1*. Adicionalmente, *JcNIP5;1* e *JcNIP6;1* apresentaram valina no terceiro resíduo do

segundo motivo NPA. A subfamília SIP apresentou o segundo domínio NPA conservado, mas na terceira posição do primeiro NPA a alanina foi substituída por treonina em *JcSIP1;1* (a, b e c) e por leucina em *JcSIP2;1* (Tabela 2).

A sequência do filtro ar/R variou entre e dentro de cada subfamília, mas manteve-se conservada em PIP (fenilalanina-histidina-treonina-arginina). Na subfamília NIP, as posições LE1 e LE2 do filtro ar/R foram caracterizadas por alanina e arginina, respectivamente, exceto *JcNIP2;1* que apresentou glicina em LE1. No subgrupo *JcNIP1*, as posições H2 e H5 continham triptofano e valina (exceto *JcNIP1;1* – metionina em H5). *JcNIP2;1* possui glicina (H2) e serina (H5), enquanto *JcNIP5;1* e *JcNIP6;1* possuem serina (H2) e isoleucina (H5).

Na subfamília SIP, há conservação nas posições H5, LE1 e LE2, uma vez que o subgrupo SIP1 foi marcado por valina-prolina-asparagina, respectivamente. É possível ver um certo padrão de conservação nos subgrupos de TIP. Em *JcTIP1*, temos histidina (H2) – isoleucina (H5) – alanina (LE1) – valina (LE2), exceto para *JcTIP1;1c* que apresenta valina em H2. Nas *JcTIP*, subgrupos 2, 3 e 4 observa-se histidina (H2), isoleucina (H5) e arginina (LE2), enquanto LE1 apresenta glicina em *JcTIP2* e arginina em *JcTIP3/4* (Tabela 2).

Em relação às posições de Froger, há maior conservação dentro de cada subfamília, mas variabilidade entre as diferentes subfamílias. Em NIP, caracteristicamente tem-se fenilalanina (P1) – serina (P2) – alanina (P3) – tirosina (P4) – leucina (P5), exceto em *JcNIP1;2a* (fenilalanina em P4) e *JcNIP1;1* (isoleucina em P5). A subfamília PIP apresenta variabilidade na posição 1 e as demais conservadas, serina (P2) – alanina (P3) – fenilalanina (P4) – triptofano (P5). As posições P3, P4 e P5 são conservadas em SIP e correspondem a alanina – tirosina – triptofano, respectivamente. Entre as *JcNIP* o padrão observado foi treonina (P1) – serina (P2) – alanina (P3) – tirosina (P4) – triptofano (P5), exceto por isoleucina em P1 (*JcNIP5;1*) e alanina em P3 (*JcNIP3;2* e *JcNIP5;1*) (Tabela 2).

De acordo com as nove SDPs (SDP1-SDP9), foi possível identificar *JcAQP*s relacionadas ao transporte de substratos não aquosos. Todas as *JcPIP* identificadas apresentam SDPs típica para transporte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A-G-V-F-I-H/Q-F-V-P), ureia (H-P-F-F-L-P-G-G-N) e CO<sub>2</sub> (L-I-I/M-C-A-I-D-W-D-W), além do que *JcPIP1;3* e *JcPIP7aX1* ainda estão funcionalmente associadas ao transporte de ácido bórico (T-I-H-P-E-L-L-T-P) (Tabela 3).

Tabela 2. Motivos NPA, filtros ar/R e Posições de Forger em *Jc*AQPS expressas em raízes sob salinidade (150mM).

AQP	Motivos NPA		Filtro Ar/R				Posições de Forger				
	LB	LE	H2	H5	LE1	LE2	P1	P2	P3	P4	P5
<i>Jc</i> NIP1;1	NPA	NPA	W	M	A	R	F	S	A	Y	I
<i>Jc</i> NIP1;2 <sup>a</sup>	NPA	NPA	W	V	A	R	F	S	A	F	L
<i>Jc</i> NIP1;2b	NPA	NPA	W	V	A	R	F	S	A	Y	L
<i>Jc</i> NIP2;1	NPA	NPA	G	S	G	R	L	T	A	Y	I
<i>Jc</i> NIP5;1	NPA	NPV	S	I	A	R	F	T	A	Y	L
<i>Jc</i> NIP6;1	NPS	NPV	S	I	A	R	L	T	A	Y	L
<i>Jc</i> PIP1;3	NPA	NPA	F	H	T	R	E	S	A	F	W
<i>Jc</i> PIP2;4 <sup>a</sup>	NPA	NPA	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
<i>Jc</i> PIP2;4b	NPA	NPA	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
<i>Jc</i> PIP2;8	NPA	NPA	F	H	T	R	M	S	A	F	W
<i>Jc</i> PIP7aX1	NPA	NPA	F	H	T	R	E	S	A	F	W
<i>Jc</i> SIP1;1 <sup>a</sup>	NPT	NPA	A	V	P	N	M	A	A	Y	W
<i>Jc</i> SIP1;1b	NPT	NPA	V	V	P	N	I	A	A	Y	W
<i>Jc</i> SIP1;1c	NPT	NPA	S	V	P	N	M	A	A	Y	W
<i>Jc</i> SIP2;1	NPL	NPA	S	H	G	S	F	V	A	Y	W
<i>Jc</i> TIP1;1 <sup>a</sup>	NPA	NPA	H	I	A	V	T	S	A	Y	W
<i>Jc</i> TIP1;1b	NPA	NPA	H	I	A	V	T	S	A	Y	W
<i>Jc</i> TIP1;1c	NPA	NPA	H	V	A	V	T	S	A	Y	W
<i>Jc</i> TIP1;3	NPA	NPA	H	I	A	V	T	S	A	Y	W
<i>Jc</i> TIP2;1	NPA	NPA	H	I	G	R	T	S	A	Y	W
<i>Jc</i> TIP2;2	NPA	NPA	H	I	G	R	T	S	A	Y	W
<i>Jc</i> TIP3;2	NPA	NPA	H	I	A	R	T	A	A	Y	W
<i>Jc</i> TIP4;1	NPA	NPA	H	I	A	R	T	S	A	Y	W
<i>Jc</i> TIP5;1	NPA	NPA	N	V	G	S	I	A	A	Y	W

Todas as *Jc*NIP apresentam SDPs típicas de transportadores de ureia (H-P-I/L/T/F-A/F-L/M-P/A-G-S-N), exceto *Jc*NIP1;1. A maioria das *Jc*NIPs identificadas também possui SDPs típicas para o transporte de ácido bórico (V/T-I/V-H-P-E-L/I-L/I-A-P). *Jc*NIP 2;1 e *Jc*NIP5;1 possuem SDPs típicas do transporte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A/S-A-L-L/V/A-V/I-Y-V-P) e *Jc*NP2;1 foi a única *Jc*AQP identificada com SDPs para o transporte de ácido salicílico (G-F-V-H-G-N-R-T-K). Todos os membros identificados da subfamília TIP apresentam SDPs típicas para o transporte de ureia (H-P-L/F-L/A/F-L-A/P-G-S/G-N), exceto *Jc*TIP3;2; e *Jc*TIP1;3 também possui SDPs típicas de transportadores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (S-A-L-A-I-H-Y-V-P) (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo das típicas SDPs identificadas em *JcAQP*s expressas em raízes de *J. curcas* sob salinidade (150mM).

<b>SDPs</b>	<b>SDP1</b>	<b>SDP2</b>	<b>SDP3</b>	<b>SDP4</b>	<b>SDP5</b>	<b>SDP6</b>	<b>SDP7</b>	<b>SDP8</b>	<b>SDP9</b>
<b>Aquaporinas</b>									
<b>Típico transportador de ácido bórico</b>	<b>T/V</b>	<b>I/V</b>	<b>H/I</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>I/L</b>	<b>I/L/T</b>	<b>A/T</b>	<b>A/G/K/P</b>
<i>JcNIP1;2b</i>	V	I	H	P	E	L	I	A	P
<i>JcNIP2;1</i>	V	V	H	P	E	I	L	A	P
<i>JcNIP5;1</i>	T	I	H	P	E	L	L	A	P
<i>JcNIP6;1</i>	T	I	H	P	E	L	L	A	P
<i>JcPIP1;3</i>	T	I	H	P	E	L	L	T	P
<i>JcPIP7aX1</i>	T	I	H	P	E	L	L	T	P
<b>Típico transportador de CO<sub>2</sub></b>	<b>I/L/V</b>	<b>I</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>I/V</b>	<b>D</b>	<b>W</b>	<b>D</b>	<b>W</b>
<i>JcPIP1;3</i>	L	I	C	A	I	D	W	D	W
<i>JcPIP2;4a</i>	L	M	C	A	V	D	W	D	W
<i>JcPIP2;4b</i>	I	M	C	A	V	D	W	D	W
<i>JcPIP7aX1</i>	I	M	C	A	I	D	W	D	W
<i>JcPIP2;8</i>	L	M	C	A	I	D	W	D	W
<b>Típico transportador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>A/S</b>	<b>A/G</b>	<b>L/V</b>	<b>A/F/L/T/V</b>	<b>I/L/V</b>	<b>H/I/L/Q</b>	<b>F/Y</b>	<b>A/V</b>	<b>P</b>
<i>JcNIP2;1</i>	A	A	L	L	V	I	Y	V	P
<i>JcNIP5;1</i>	S	A	L	V	V	I	Y	V	P
<i>JcTIP1;3</i>	S	A	L	A	I	H	Y	V	P
<i>JcPIP1;3</i>	A	G	V	F	I	H	F	V	P
<i>JcPIP2;4a</i>	A	G	V	F	I	Q	F	V	P
<i>JcPIP2;4b</i>	A	G	V	F	I	Q	F	V	P
<i>JcPIP7aX1</i>	A	G	V	F	I	H	F	V	P
<i>JcPIP2;8</i>	A	G	V	F	I	H	F	V	P

Tabela 3. Continuação.

<b>SDPs</b>	<b>SDP1</b>	<b>SDP2</b>	<b>SDP3</b>	<b>SDP4</b>	<b>SDP5</b>	<b>SDP6</b>	<b>SDP7</b>	<b>SDP8</b>	<b>SDP9</b>
<b>Aquaporinas</b>									
<b>Típico transportador de ácido silícico</b>	<b>C/S</b>	<b>F/Y</b>	<b>A/E/L</b>	<b>H/R/Y</b>	<b>G</b>	<b>K/N/T</b>	<b>R</b>	<b>E/S/T</b>	<b>A/K/P/T</b>
<i>JcNIP2;1</i>	<b>G</b>	F	<b>V</b>	H	G	N	R	T	K
<b>Típico transportador de ureia</b>	<b>H</b>	<b>P</b>	<b>F/I/L/T</b>	<b>A/C/F/L</b>	<b>L/M</b>	<b>A/G/P</b>	<b>G/S</b>	<b>G/S</b>	<b>N</b>
<i>JcNIP1;2a</i>	H	P	I	A	L	P	G	S	N
<i>JcNIP1;2b</i>	H	P	L	A	L	P	G	S	N
<i>JcNIP2;1</i>	H	P	T	A	M	P	G	S	N
<i>JcNIP5;1</i>	H	P	I	A	L	P	G	S	N
<i>JcNIP6;1</i>	H	P	I	A	L	P	G	S	N
<i>JcTIP1;1a</i>	H	P	F	F	L	A	G	S	N
<i>JcTIP1;1b</i>	H	P	F	F	L	A	G	S	N
<i>JcTIP1;1c</i>	H	P	F	F	L	A	G	S	N
<i>JcTIP1;3</i>	H	P	F	F	L	A	G	S	N
<i>JcTIP4;1</i>	H	P	L	L	L	A	G	S	N
<i>JcTIP2;1</i>	H	P	F	A	L	P	G	S	N
<i>JcTIP2;2</i>	H	P	F	A	L	P	G	S	N
<i>JcTIP5;1</i>	H	P	F	A	L	P	G	S	N
<i>JcPIP1;3</i>	H	P	F	F	L	P	G	G	N
<i>JcPIP2;4a</i>	H	P	F	F	L	P	G	G	N
<i>JcPIP2;4b</i>	H	P	F	F	L	P	G	G	N
<i>JcPIP7aX1</i>	H	P	F	F	L	P	G	G	N
<i>JcPIP2;8</i>	H	P	F	F	L	P	G	G	N

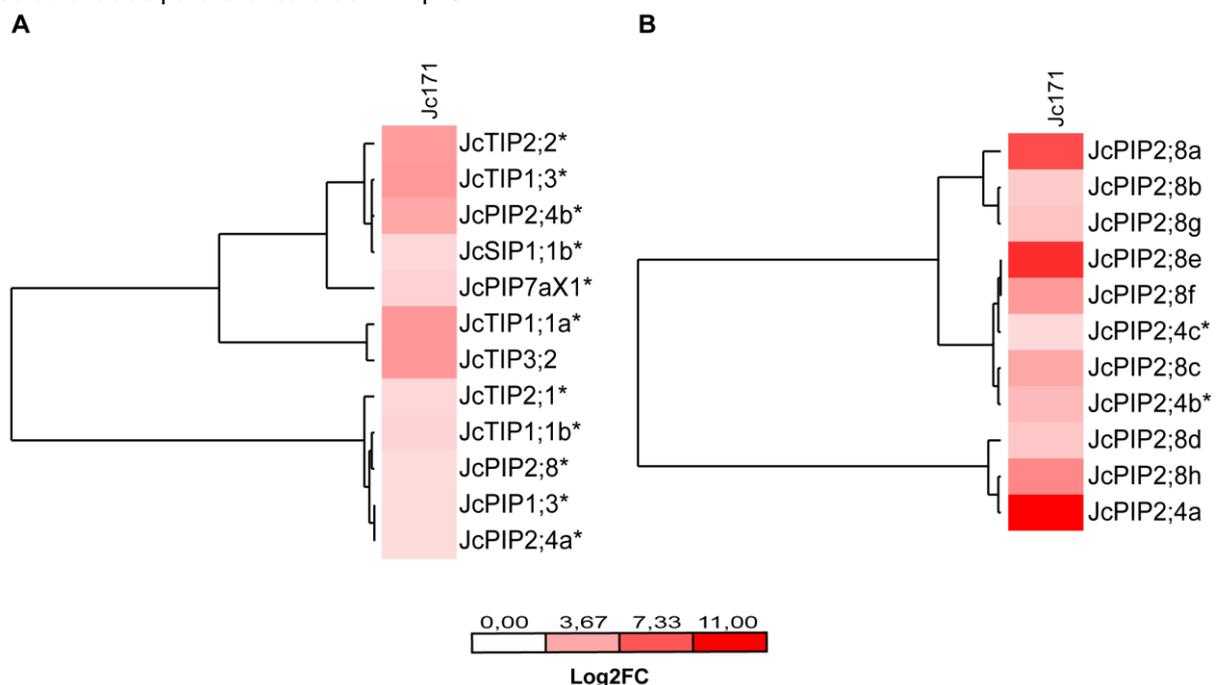
\*Os resíduos SDP nas AQPs de *J. curcas* que são diferentes dos SDPs típicos estão destacados em vermelho e foram determinados conforme Zou et al. (2016).

### Perfil de expressão das *JcAQP*s sob condição salina (150mM NaCl)

Para revelar a orquestração transcricional das *JcAQP*s na resposta à salinidade, o padrão de expressão dos 59 transcritos codificadores de aquaporinas foi obtido via RNA-Seq. Os resultados mostraram que apenas o acesso Jc171 apresentou transcritos codificadores de *JcAQP*s diferencialmente expressos (DE,  $p\text{-value} \leq 0,0001$ ,  $FDR \leq 0,005$ ,  $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$  or  $\leq -1$ ), sendo que 22 unigenes tiveram sua expressão induzida (UR) após estímulo salino (Figura 4). É importante destacar que 50% dos unigenes induzidos correspondem à 12 transcritos completos codificadores de aquaporinas das subfamílias TIP (06), PIP (05) e SIP (01) (Figura 4A). Por outro lado, 11 unigenes com anotação para aquaporinas da subfamília PIP (subgrupo 2) tiveram sua expressão aumentada sob estímulo de sal, mas correspondem a transcritos com CDS incompleta (Figura 4B).

É possível perceber que as aquaporinas da subfamília TIP (*JcTIP2;2*, *JcTIP1;3*, *JcTIP1;1a*, *JcTIP3;2*) e *JcPIP2;4b* destacam-se por apresentarem maior modulação da expressão ( $\text{Log}_2\text{FC} > 4$ ) em resposta ao sal (Figura 4A). Em relação aos transcritos incompletos, destacam-se *JcPIP2;8a*, *JcPIP2;8e* e *JcPIP2;4a* que possuem os maiores valores de indução detectada ( $\text{Log}_2\text{FC} > 7$ ) (Figura 4b).

Figura 4. Heatmap mostrando o perfil de expressão dos transcritos codificadores de *JcAQP*s induzidos (DE;  $p\text{-value} \leq 0,0001$ ,  $FDR \leq 0,005$ ,  $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$  or  $\leq -1$ ) em Jc171 após tratamento salino (150 mM NaCl). (a) transcritos completos, (b) transcritos incompletos. Os unigenes induzidos são indicados em vermelho e a intensidade da cor está de acordo com a legenda ( $\text{Log}_2\text{FC}$ ). \*Alvos selecionados para o ensaio de RT-qPCR.



### Validação da Expressão das JcAQPs DEGs via RT-qPCR

Os trezes alvos selecionados codificadores de AQPs com expressão diferencial em resposta ao sal (150 mM NaCl; 3h) foram analisados via RT-qPCR para confirmação da expressão *in silico*. Os transcritos codificadores das JcAQPs selecionados e os genes de referência apresentaram o amplicon esperado conforme curva de dissociação (Figura S1). Os parâmetros de RT-qPCR que incluem eficiência de amplificação (*E*), declive (*S*) e coeficiente de correlação (*R*) derivados da curva padrão foram obtidos a partir da diluição seriada das amostras de cDNA (Tabela 4). Todos os primers utilizados nas reações apresentaram valores aceitáveis desses parâmetros conforme recomendável pelo protocolo MIQE (BUSTIN et al., 2009). A análise da expressão via RT-qPCR confirmou a maioria dos resultados da expressão *in silico* (92,3%), o que reforça a modulação e atuação das JcAQPs em resposta à salinidade (Tabela 4).

Tabela 4. Expressão gênica relativa e parâmetros RT-qPCR [eficiência de amplificação (*E*), declive (*S*), coeficiente de correlação (*R*) e interceptação *Y*] derivados de JcAQPs expressas em transcriptoma de raízes de *J. curcas* submetidas a exposição salina (3h, NaCl 150 mM).

Gene (candidato/ Referência)	<i>E</i> (%)	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>Y</i> intercept	<i>In silico</i> <sup>a</sup>	RT-qPCR <sup>b</sup>
<i>JcPIP1;3</i>	90,00	-0,999	-3,59	28,98	1,508 (UR)	1,636 (UR)
<i>JcPIP2;4a</i>	92,65	-0,999	-3,51	30,16	1,508 (UR)	2,003 (UR)
<i>JcPIP2;4b</i>	106,33	-0,953	-3,18	30,21	3,720 (UR)	9, 232 (UR)
<i>JcPIP2;4b*</i>	93,04	-0,995	-3,5	35,54	2,961 (UR)	3,026 (UR)
<i>JcPIP2;4c*</i>	93,07	-0,995	-3,5	30,13	1,609 (UR)	1,726 (UR)
<i>JcPIP2;8b</i>	90,73	-1	-3,57	30,42	1,471 (UR)	1,741 (UR)
<i>JcPIP7aX1</i>	99,85	-0,91	-3,33	26,61	1,899 (UR)	2,350 (UR)
<i>JcSIP1;1b</i>	107,57	-0,996	-3,15	33,44	1,706 (UR)	1,652 (UR)
<i>JcTIP1;1a</i>	90,66	-0,994	-3,57	34,84	4,405 (UR)	4,64 (UR)
<i>JcTIP1;1b</i>	90,47	-0,998	-3,57	30,53	1,870 (UR)	1,231 (n.s.)
<i>JcTIP1;3</i>	94,76	-0,998	-3,45	32,77	4,361 (UR)	5,566 (UR)
<i>JcTIP2;1</i>	95,21	-0,996	-3,44	31,32	1,693 (UR)	1,374 (UR)
<i>JcTIP2;2</i>	102,94	-0,998	-3,25	31,5	4,257 (UR)	4,577 (UR)
<i>JcActin</i> <sup>a</sup>	90,15	-0,998	-3,58	26,99		
<i>Jcβ-tubulin</i> <sup>a</sup>	96,00	-0,986	-3,42	30,9		

\*Alvo possui transcrito incompleto; <sup>a</sup>Genes de Referência.

## Discussão

As aquaporinas compreendem um grupo diverso de proteínas que desenvolve papel chave no desenvolvimento das plantas, sendo constantemente associadas à resposta de tolerância a estresses abióticos como a seca, o estresse osmótico e a salinidade (BEZERRA-NETO et al., 2019). De acordo com estudos de expressão gênica, os diferentes membros da família de aquaporinas podem ser induzidos ou reprimidos sob salinidade. Portanto, compreender a nível molecular o modo como as aquaporinas são reguladas em *J. curcas* sob tal condição representa um grande potencial para aplicações no melhoramento genético dessa espécie.

*J. curcas* possui identificado em seu genoma 32 genes *JcAQP* classificados em cinco subfamílias, PIP (9), TIP (9), NIP (8), SIP (4) e XIP (2) (ZOU et al., 2016). Em nosso estudo, um total de 59 transcritos codificadores de *JcAQPs* foram identificados no transcriptoma de *J. curcas* expresso sob NaCl (150 mM, 3h). Análises detalhadas permitiram identificar que 40% (24) correspondem a transcritos com CDS completas que codificam *JcAQPs* classificadas em quatro subfamílias (NIP, PIP, SIP e TIP).

A análise de caracterização das aquaporinas expressas em raízes de *J. curcas* sob salinidade corroboram estudos prévios dessa família no genoma da espécie. A análise da estrutura exon-íntron permitiu observar padrões característicos para cada subfamília. Conforme reportado por Zou et al. (2016), a subfamília TIP caracteristicamente apresenta dois íntrons com exceção da TIP1;1 que possui apenas um. Em nossos achados, além desse padrão, observamos uma TIP1 (*JcTIP1;1a*) com dois íntrons. Em relação à PIP, observou-se a presença de três íntrons em todas as AQPs identificadas. Embora essa seja a estrutura íntron-exon (3/4) comum nessa subfamília, *JcPIP 1;3* foi relatada como exceção por apresentar quatro íntrons. Curiosamente, no transcriptoma analisado, *JcPIP1;3* segue o padrão com três íntrons.

As aquaporinas do tipo NIP normalmente apresentam quatro íntrons, com exceção de *JcNIP5;1* que apresenta um íntron a menos. Aqui, além de *JcNIP5;1*, encontramos *JcNIP1;1* que também possui apenas três íntrons. Nas *JcAQPs* do tipo SIP também observamos uma exceção ao que há relatado na literatura uma vez que *JcSIP1;1b* possui dois íntrons, SIP1 geralmente não apresentam íntrons (KHAN et al., 2015).

Encontrou-se *JcAQP*s que possuem estrutura íntron-exon característica da subfamília (TIP1;1 e PIP1,3). Por outro lado, NIP1;1a difere do padrão comum de seu respectivo subgrupo, devido à perda de um íntron. Adicionalmente, observou-se que *JcSIP1;1b* tem estrutura mais semelhante ao subgrupo SIP2 por apresentar íntrons. Isso revela possíveis modificações evolutivas ao longo da expansão das diferentes subfamílias de *JcAQP*, bem como padrões específicos em cada subgrupo. Estudos evolutivos da família Aquaporina demonstram que modificações estruturais e duplicação gênica em *tandem* são os principais processos moleculares envolvidos na estrutura filogenética desta família em plantas (BEZERRA-NETO et al., 2019; ZOU et al., 2016).

A análise do MEME reforça a ideia de um padrão característico para cada subfamília, e até mesmo para subgrupos. Motivos específicos encontrados em SIP (motivo 9) e PIP (motivos 8 e 10) sugerem modificações nas sequências dessas proteínas que podem implicar em funções próprias de cada subfamília. As *JcSIP* possuem um padrão bem diferenciado das demais subfamílias, uma vez que apresentam poucos motivos (em geral quatro), incluindo a deleção do motivo 2 associado ao primeiro NPA. Essas modificações podem afetar a estrutura e função dessas proteínas como a permeabilidade e transporte de água (HUSSAIN et al., 2020). Padrão semelhante também foi identificado em SIP de milho (*Zea mays* L.) e pepino (*Cucumis sativus* L.) (BARI et al., 2018, ZHU et al., 2019).

As aquaporinas são proteínas de membrana que facilitam o transporte de água e pequenos solutos de acordo com o ambiente osmótico. São classificadas em dois grandes grupos: canais estritamente seletivos a água (wAQP); ou canais que, além da água, transportam solutos como a ureia e glicerol (conhecidos como aquagliceroproteínas, gliceroporinas ou GLPs) (KITCHEN et al., 2019). Regiões conservadas como os domínios NPA, filtro de seletividade ar/R e posições de Froger são cruciais na especificação do substrato das AQP's (HUSSAIN et al., 2020).

Todas *JcPIP* identificadas possuem F-H-T-R no filtro de seletividade ar/R, os dois motivos NPA e as posições de Froger P2-P5 (S-A-F-W) conservados. Esses resíduos conservados permitem a formação de poros hidrofílicos que favorecem a permeabilidade à água (ZOU et al., 2015b). Resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos anteriores de aquaporinas de *J. curcas*, além dessas regiões serem conservadas em outros membros de euforbiáceas como *R. communis*

L. e *H. brasiliensis* Muell. Arg. (ZOU et al., 2016; ZOU et al., 2015a; ZOU et al., 2015b)

Além da permeabilidade à água, à subfamília PIP em plantas é atribuído o transporte de ureia, ácido bórico, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O padrão S-A-F-W (P2-P5) encontrado em todas as JcPIP é reportado como indicativo de transporte de CO<sub>2</sub> (HOVE; BHAVE, 2011). Isso é confirmado pela análise das SDPs, no qual as JcPIPs apresentaram o padrão típico para o transporte de CO<sub>2</sub>, L-I/M-C-A-I-D-W-D-W. É importante destacar que todas JcPIP identificadas aqui (exceto JcPIP1;3) possuem o resíduo metionina (M) ao invés de isoleucina (I) na SDP2, isso representa uma nova SDP, mas essa modificação já foi relatada em PIPs de *J. curcas* anteriormente (ZOU et al., 2016).

Conforme a análise das SDPs, as JcPIP também estão associadas funcionalmente ao transporte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma molécula importante na sinalização do estresse, entretanto por ser uma espécie reativa de oxigênio (ROS) pode provocar graves danos celulares. PIPs de outras espécies de plantas já foram relatadas por facilitarem o transporte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através das membranas sob condições de estresse (JANG et al., 2012).

Diferentemente das PIPs, as JcNIPs apresentam maior variabilidade. Observamos que no segundo motivo NPA há uma troca de alanina (A) por valina (V) em JcNIP5;1 e JcNIP6;1. Essa modificação é compatível com transporte de formamida, urea e glicerol e menor atividade no transporte de água, relatado anteriormente em algumas AQPs de *A. thaliana* e de abacaxi (*Ananas comosus*) (FORREST; BHAVE, 2007; BEZERRA-NETO et al., 2019). Entre as euforbiáceas, é comum também ocorrer modificação no primeiro motivo NPA, onde há uma troca do terceiro resíduo por serina (S) em NIP5;1 e NIP6;1 (ZOU et al., 2015a,b; ZOU; YANG, 2019). Esta última modificação ocorreu apenas em JcNIP6;1.

As JcNIPs também diferem das demais subfamílias nas posições de Froger que são compostas por uma mistura de resíduos característicos de canais de água puro - AqpZ (P2-P4) e facilitadores de Glicerol - GIpF (P1 e P5). Isso sugere que as JcNIPs têm a capacidade de transportar glicerol e atuar na formação e translocação de óleo (ZOU et al., 2015a).

Conforme a análise de SDP, JcNIP2;1 possui resíduos característicos para o transporte de ácido silícico, embora existam duas modificações nas SDP1 e SDP3 já reportadas por Zou et al. (2016). Além disso, JcNIP2;1 possui os resíduos G-S-G-R

no filtro de seletividade ar/R, o qual determinam a capacidade das plantas de absorverem silício (LI et al., 2019b).

A subfamília SIP também apresenta modificações nas regiões críticas das aquaporinas. O primeiro motivo NPA é caracterizado por uma troca no terceiro resíduo por treonina (T) ou leucina (L), respectivamente em *JcSIP1* e *JcSIP 2*. Alterações nas regiões NPA podem afetar a permeabilidade a água. Outra característica que suporta isso, são variações nas posições de Froger, apenas P3 e P5 são resíduos conservados característicos dos canais de água puro-AqpZ.

A subfamília TIP em plantas é caracterizada por localizar-se na membrana do vacúolo. Embora a localização das *JcTIPs* conforme Deep-Loc ocorra apenas no tonoplasto, a localização pelo Wolf-Psort aponta algumas divergências como a ocorrência na membrana plasmática (*JcTIP1;1*) e citoplasma (*JcTIP3;2*, *JcTIP4;1*, *JcTIP5;1*). As *TIP1;1* e *TIP3;2/4;1/5;1* de *J. curcas* com as mesmas características de peso molecular, ponto isoelétrico, motivos NPA, filtro de seletividade ar/R e posições de Froger já foram caracterizadas por localizarem-se na membrana plasmática e vacúolo, respectivamente (ZOU et al., 2016).

Em relação ao filtro de seletividade ar/R fica evidente um padrão específico por subgrupo, de modo que *JcTIP1* predominantemente possui H-I-A-V que é mais hidrofóbico do que os resíduos presentes em *JcTIP2* (H-I-G-R) e *JcTIP3/4* (H-I-A-R). Esses resíduos conservados em cada subgrupo das *JcTIPs* são comuns em outras espécies de plantas (LI et al., 2019b; LIU et al, 2019).

As aquaporinas da subfamília TIP estão relacionadas ao transporte de pequenos solutos. Todas as *JcTIPs* foram associadas ao transporte de ureia por possuírem as SDPs típicas conforme Hove e Bhave (2011). Além disso, todas possuem resíduos conservados nas posições de Froger (T-S-A-Y-W) que são comuns de transportadores de ureia e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (BEZERRA-NETO et al., 2019). Apenas a *JcTIP1;3* apresentou SDPs típicas para o transporte de peróxido de hidrogênio.

A análise da expressão das *JcAQPs* foi bastante contrastante entre os dois acessos analisados. *Jc171* apresentou um conjunto de 22 unigenes com expressão induzida (UR) em resposta ao sal (150 NaCl), enquanto não houve modulação transcricional em *Jc183*. A regulação das aquaporinas é influenciada por diferentes fatores, incluindo maior e menor expressão em diferentes acessos de uma mesma espécie sob salinidade (SUTKA et al., 2011).

A tolerância à salinidade em *J. curcas* é dependente do genótipo. Os acessos Jc183 e Jc171 respondem de modo diferente quando submetidos às mesmas condições de salinidade (250, 500 e 750 mM NaCl). Jc183 é considerado mais tolerante ao estresse salino do que Jc171 e possui rápida recuperação das taxas fotossintéticas e crescimento após o estresse (REAL et al., 2019). Uma vez que Jc183 tolera melhor altas doses de salinidade, sugere-se aqui que a manutenção da homeostase e balanço hídrico em suas raízes após 3h sob 150 mM NaCl não envolve a expressão diferencial das AQPs.

Apesar de apresentar uma capacidade de recuperação mais lenta após ser submetido a condições salinas severas, Jc171 também é considerado um acesso tolerante (LOZANO-ISLA et al., 2018; REAL et al., 2019) no qual a indução das aquaporinas na resposta inicial (3h) faz parte da estratégia de mitigação dos efeitos adversos provocados pelo sal.

As duas subfamílias mais relacionadas à resposta do Jc171 ao sal foram PIP e TIP que apresentaram, respectivamente, 15 e 6 unigenes com expressão induzida após 3h sob exposição ao sal. A indução de aquaporinas PIP e TIP na resposta inicial de *J. curcas* foi identificado anteriormente em um estudo da análise global da expressão em raízes submetidas a estresse salino (2h 100 mM NaCl) (ZHANG et al., 2014).

O papel das PIPs na resposta inicial ao estresse de sal também foi relatado em tomate (*Solanum lycopersicum*). Após 1h sob 150 mM NaCl, aquaporinas principalmente do subgrupo PIP2 (PIP1;5, PIP2;6, PIP2;8, PIP2;9, PIP2;11) apresentaram aumento na expressão em raízes de tomate. Ainda de modo similar aos nossos resultados, PIP2;8 foi uma das AQPs que apresentou maior modulação da expressão (JIA et al., 2020).

As *JcPIP* identificadas aqui são canais altamente permeáveis à água e localizam-se principalmente na membrana plasmática. Dessa forma, potencialmente, atuam facilitando o transporte de H<sub>2</sub>O do meio extracelular para o citoplasma, o que reduz a toxicidade causada pelo NaCl. A indução das *JcPIP* deve contribuir tanto para a captação de água, como para evitar a perda de água pelas raízes durante o estágio inicial do estresse salino (ZHANG et al., 2014; JANG; AHN, 2015).

Todos os transcritos completos codificadores de PIPs foram caracterizados como transportadores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e induzidos em resposta ao sal. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é uma espécie reativa de oxigênio (ROS) importante na sinalização do estresse em plantas (JANG

et al., 2012). Entretanto, um dos efeitos adversos do estresse salino é o rápido acúmulo de ROS, onde elevados níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> implicam na injúria da membrana e danos oxidativos em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (MILLER et al., 2010).

O papel das aquaporinas no transporte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tem sido relatado. De modo semelhante aos nossos achados, uma aquaporina da subfamília PIP (*MsPIP2;2*) de *Medicago sativa* relacionada à tolerância a salinidade, apresenta aumento na expressão em raízes sob estresse de sal (150 mM NaCl, 2h e 4h). Além disso, a superexpressão de *MsPIP2;2* em *A. thaliana* demonstrou uma redução no conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e consequente diminuição do acúmulo de ROS (LI et al., 2019a). Dessa forma, *JcPIPs* possivelmente também atuam facilitando a difusão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aliviando os danos do estresse oxidativo provocados pelo sal.

Enquanto as PIP atuam no transporte de água transcelular, as aquaporinas da subfamília TIP estão envolvidas na troca de água entre o citosol e o vacúolo para garantir o ajuste osmótico (Zou et al., 2015b). Além do rápido ajuste osmótico, as TIPs são as proteínas mais comuns do tonoplasto que desempenham papel chave na manutenção da osmolaridade e do turgor celular (PAWŁOWICZ et al., 2017).

O aumento da expressão de aquaporinas PIP (*EgPIP1* e *EgPIP2*) e TIP (*EgTIP2*) em raízes de *Eucalyptus grandis* submetidas a estresse osmótico (Polietilenoglicol - PEG800) foi detectado na resposta inicial (6h) (RODRIGUES et al., 2013). Esses autores sugerem que a regulação positiva e coordenada de PIPs e TIPs é importante para manter a homeostase adequada de H<sub>2</sub>O bem como lidar com o déficit hídrico causado pelo estresse osmótico. Uma vez que o estresse salino leva ao estresse osmótico, a indução de *JcPIP* e *JcTIP* reforça a atuação no transporte de água para garantir o ajuste osmótico.

As TIPs também atuam reduzindo o estresse oxidativo. Assim como *JcTIP1;3*, outras TIP tem a capacidade de facilitar o transporte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A indução de *JcTIP1;3* pode estar relacionada ao influxo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo vacúolo. As enzimas presentes no vacúolo como as peroxidases atuam reduzindo os níveis de ROS citosólicos e aliviam os danos causados pelo estresse oxidativo (WANG et al., 2014).

A superexpressão de TIP também é relatado em plantas halófitas. Uma TIP de *Kosteletzkya virginica* (*KvTIP3*) é expressa predominantemente em raízes e o aumento da expressão em resposta ao sal (300 mM NaCl) ocorre no estágio inicial do estresse (6h) (LIU et al., 2020). Isso corrobora o papel das aquaporinas TIPs na tolerância ao estresse salino.

As aquaporinas induzidas das subfamílias PIP e TIP estão associadas ao transporte de ureia, uma forma de nitrogênio no solo disponível para raízes de plantas (KOJIMA; BOHNER; WIREN, 2006). A salinidade (NaCl) induz a deficiência de nitrogênio, de modo que o transporte de ureia melhora o crescimento vegetal e o rendimento dos frutos em plantas sob estresse salino (3,5 g NaCl kg<sup>-1</sup> solo) (KAYA; HIGGS, 2011).

Aquaporina TIP de milho (*ZmTIP4;4*) teve sua expressão aumentada em raízes sob deficiência de nitrogênio. A indução de *ZmTIP4;4* está relacionada ao transporte de ureia vacuolar para o citoplasma, seguido de degradação em amônia e consequente assimilação de nitrogênio (GU et al., 2011). É possível que as *JcPIP* e *TIP* desempenhe papel chave na regulação do metabolismo do nitrogênio sob condições salinas. Além disso, é importante destacar que *JcNIPs* também são caracterizadas como transportadores de ureia, embora sua expressão não tenha modulado em resposta ao sal.

Por fim, identificamos transcritos codificadores de quatro subfamílias de aquaporinas em transcriptoma de raízes de *J. curcas* em resposta inicial ao sal. A indução das AQPs pelo acesso Jc171 envolveu, principalmente, representantes das subfamílias PIP e TIP, que desempenham diferentes papéis na resposta ao sal como: o balanço hídrico, são canais permeáveis a água; controle do estresse osmótico e alívio do estresse oxidativo pelo transporte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, além do possível transporte de ureia que pode corrigir a deficiência de nitrogênio causada pelo NaCl.

## **Conclusão**

Conclusivamente, caracterizamos a família aquaporina em transcriptoma de raízes de *J. curcas* submetidas ao sal (150 mM NaCl; 3h). Os acessos analisados respondem de modo contrastante, onde não há modulação das *JcAQPs* pelo Jc183, acesso tolerante a doses mais elevadas de salinidade. O acesso Jc171, sensível à altas doses de salinidade, envolve a regulação positiva das aquaporinas principalmente das subfamílias PIP (*JcPIP2;4a/b*, *JcPIP2;8a/e*) e TIP (*JcTIP 1;1a*, *JcTIP 1;3*, *JcTIP2;2*, *JcTIP3;2*) como estratégia de controlar os danos do estresse osmótico e oxidativo provocados pelo NaCl. Os dados aqui apresentados fornecem informações valiosas da resposta molecular do pinhão manso ao estresse salino e podem fornecer um recurso biotecnológico útil no melhoramento dessa e de outras espécies na tolerância à salinidade.

## Referências Bibliográficas

- AFZAL, Z. et al. The roles of aquaporins in plant stress responses. **Journal of developmental biology**, v. 4, n. 1, p. 9, 2016. <https://doi.org/10.3390/jdb4010009>
- ARMENTEROS, J. J. A. et al. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. **Bioinformatics**, v. 33, n. 21, p. 3387-3395, 2017.
- BARI, A. et al. Genome-wide bioinformatics analysis of aquaporin gene family in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology**, v. 6, p. 197, 2018. <https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000197>
- BEZERRA-NETO, J. P. et al. Plant aquaporins: diversity, evolution and biotechnological applications. **Current Protein and Peptide Science**, v. 20, n. 4, p. 368-395, 2019. <https://doi.org/10.2174/1389203720666181102095910>
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- BUSHMANOVA, E. et al. rnaQUAST: a quality assessment tool for de novo transcriptome assemblies. **Bioinformatics**, v. 32, n. 14, p. 2210-2212, 2016. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw218>
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CABRAL, G. A. L. et al. First Expressed TFome of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) After Salt Stimulus. **Plant Molecular Biology Reporter**, p. 1-20, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11105-019-01187-w>
- CHAUMONT, F.; TYERMAN, S. D. **Plant Aquaporins**. Springer International Publishing: New York, NY, USA, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-49395-4>
- FINN, R. N.; CERDA, J. Evolution and functional diversity of aquaporins. **The Biological Bulletin**, v. 229, n. 1, p. 6-23, 2015. <https://doi.org/10.1086/BBLv229n1p6>
- FORREST, K. L.; BHAVE, M. Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. **Functional & integrative genomics**, v. 7, n. 4, p. 263, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10142-007-0049-4>
- GRABHERR, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644, 2011. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- GU, R. et al. Isolation and characterization of three maize aquaporin genes, *ZmNIP2*; 1, *ZmNIP2*; 4 and *ZmTIP4*; 4 involved in urea transport. **BMB Reports**, v. 45, n. 2, p. 96-101, 2011. <http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2012.45.2.96>

HALL, T. A. et al. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999. p. 95-98.

HOVE, R. M.; BHAVE, M. Plant aquaporins with non-aqua functions: deciphering the signature sequences. **Plant molecular biology**, v. 75, n. 4-5, p. 413-430, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9737-5>

HUSSAIN, A. et al. Comparative phylogenetic analysis of aquaporins provides insight into the gene family expansion and evolution in plants and their role in drought tolerant and susceptible chickpea cultivars. **Genomics**, v. 112, n. 1, p. 263-275, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.02.005>

JANG, H. Y.; AHN, S. J. Overexpression of jatropha aquaporin genes, JcPIP1 and JcPIP2, does not alter response to salt and drought stresses in transgenic *Arabidopsis*. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 27-33, 2015. <https://doi.org/10.1007/s12892-014-0100-7>

JANG, J. Y. et al. Aquaporin as a membrane transporter of hydrogen peroxide in plant response to stresses. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 9, p. 1180-1181, 2012. <https://doi.org/10.4161/psb.21178>

JIA, J. et al. The expression response of plasma membrane aquaporins to salt stress in tomato plants. **Environmental and Experimental Botany**, p. 104190, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104190>

JOHANSON, U. et al. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. **Plant physiology**, v. 126, n. 4, p. 1358-1369, 2001. <https://doi.org/10.1104/pp.126.4.1358>

JONAS, M.; KETLOGETSWE, C.; GANDURE, J. Variation of *Jatropha curcas* seed oil content and fatty acid composition with fruit maturity stage. **Heliyon**, v. 6, n. 1, p. e03285, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03285>

KAYA, C.; HIGGS, D. Relationship between water use and urea application in salt-stressed pepper plants. **Journal of plant nutrition**, v. 26, n. 1, p. 19-30, 2011. <https://doi.org/10.1081/PLN-120016495>

KHAN, K. et al. Heterologous expression of two *Jatropha* aquaporins imparts drought and salt tolerance and improves seed viability in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0128866, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128866>

KITCHEN, P. et al. Water channel pore size determines exclusion properties but not solute selectivity. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56814-z 1>

KOJIMA, S.; BOHNER, A.; WIRÉN, N. V. Molecular mechanisms of urea transport in plants. **The Journal of membrane biology**, v. 212, n. 2, p. 83-91, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00232-006-0868-6>

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 323, 2011. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/12/323>

LI, S. et al. *MsPIP2; 2*, a novel aquaporin gene from *Medicago sativa*, confers salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 165, p. 39-52, 2019a. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.05.020>

LI, W. et al. Combining genome-wide and transcriptome-wide analyses reveal the evolutionary conservation and functional diversity of aquaporins in cotton. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 538, 2019b. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5928-2>

LIU, H. et al. Gene-Wide Analysis of Aquaporin Gene Family in *Malus domestica* and Heterologous Expression of the Gene *MpPIP2; 1* Confers Drought and Salinity Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 15, p. 3710, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20153710>

LIU, X. et al. The Tonoplast Intrinsic Protein Gene *KvTIP3* is Responsive to Different Abiotic Stresses in *Kosteletzkya virginica*. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1-9, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2895795>

LOZANO-ISLA, F. et al. Effects of seed storage time and salt stress on the germination of *Jatropha curcas* L. **Industrial Crops and Products**, v. 118, p. 214-224, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.052>

MAUREL, C. et al. Aquaporins in plants. **Physiological reviews**, v. 95, n. 4, p. 1321-1358, 2015. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2015>

MCGAUGHEY, S. A. et al. Regulating root aquaporin function in response to changes in salinity. **Annual Plant Reviews online**, p. 381-416, 2018. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0626>

MILLER, G. A. D. et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, cell & environment**, v. 33, n. 4, p. 453-467, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>

OLIVEIRA, L. F. **Estudo de expressão gênica em pau-ferro: estratégias otimizadas para a detecção e análise de genes associados com tolerância à seca**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Piauí.

PAWŁOWICZ, I. et al. Abiotic stresses influence the transcript abundance of PIP and TIP aquaporins in *Festuca* species. **Journal of applied genetics**, v. 58, n. 4, p. 421-435, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13353-017-0403-8>

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36-e36, 2002. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>

POMMERENIG, B. et al. Functional evolution of nodulin 26-like intrinsic proteins: from bacterial arsenic detoxification to plant nutrient transport. **New Phytologist**, v. 225, n. 3, p. 1383-1396, 2020. <https://doi.org/10.1111/nph.16217>

PUTPEERAWIT, P. et al. Genome-wide analysis of aquaporin gene family and their responses to water-deficit stress conditions in cassava. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 121, p. 118-127, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.10.025>

REAL, N. C. et al. Tolerance to salinity in *Jatropha curcas* are genotype-dependent. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 22169-22199, 2019. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n10-347>

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

RODRIGUES, M. I. et al. The tonoplast intrinsic aquaporin (TIP) subfamily of *Eucalyptus grandis*: characterization of EgTIP2, a root-specific and osmotic stress-responsive gene. **Plant science**, v. 213, p. 106-113, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.09.005>

SOUZA, M. C. P. et al. RNA-Seq transcriptome analysis of *Jatropha curcas* L. accessions after salt stimulus and unigene-derived microsatellite mining. **Industrial Crops and Products**, v. 147, p. 112168, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112168>

SUTKA, M. et al. Natural variation of root hydraulics in *Arabidopsis* grown in normal and salt-stressed conditions. **Plant physiology**, v. 155, n. 3, p. 1264-1276, 2011. <https://doi.org/10.1104/pp.110.163113>

TANG, Y. et al. Genome-wide analysis of *Jatropha curcas* MADS-box gene family and functional characterization of the JcMADS40 gene in transgenic rice. **BMC genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6741-7>

TRIFINOPOULOS, J. et al. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W232-W235, 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>

UNTERGASSER, A. et al. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 15, p. e115-e115, 2012. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>

- WANG, L. L. et al. The *Thellungiella salsuginea* tonoplast aquaporin TsTIP1; 2 functions in protection against multiple abiotic stresses. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 1, p. 148-161, 2014. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct166>
- WANG, P. et al. Genome-Wide Screening and Characterization of the Dof Gene Family in Physic Nut (*Jatropha curcas* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1-15, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19061598>
- XU, L. et al. OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W52-W58, 2019. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz333>
- ZHANG, L. et al. Global analysis of gene expression profiles in physic nut (*Jatropha curcas* L.) seedlings exposed to salt stress. **Plos one**, v. 9, n. 5, p. e97878, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097878>
- ZHU, Y. X. et al. Genome-wide identification, structure characterization, and expression pattern profiling of aquaporin gene family in cucumber. **BMC plant biology**, v. 19, n. 1, p. 345, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1953-1>
- ZOU, Z. et al. Gene structures, evolution, classification and expression profiles of the aquaporin gene family in castor bean (*Ricinus communis* L.). **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0141022, 2015a. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141022>
- ZOU, Z. et al. Genome-wide identification of *Jatropha curcas* aquaporin genes and the comparative analysis provides insights into the gene family expansion and evolution in *Hevea brasiliensis*. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 395, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00395>
- ZOU, Z. et al. Genome-wide identification of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) aquaporin genes and their response to ethephon stimulation in the laticifer, rubber-producing tissue. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 1001, 2015b. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2152-6>
- ZOU, Z.; YANG, J. Genome-wide comparison reveals divergence of cassava and rubber aquaporin family genes after the recent whole-genome duplication. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 380, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5780-4>

## 5 CONCLUSÕES

O presente trabalho identificou e analisou a expressão do primeiro transportoma de raízes de *J. curcas* submetidas à salinidade. Os dados de RNA-Seq sugerem diferentes mudanças nos perfis transcriptômicos dos dois acessos, onde a expressão diferencial do transportoma ocorre apenas em Jc171. Nossos resultados permitiram a identificação das principais famílias codificadoras de PTM relacionadas à resposta ao sal, o que inclui membros de F-ATPase, MC (transportadores mitocondriais), MFS (transportadores de açúcar) e MIP (aquaporinas) e de fatores de transcrição regulando genes PTM. Esse estudo realizou ainda a caracterização *in silico* da família aquaporina e identificou membros das subfamílias PIP e TIP envolvidos na resposta ao sal. Os resultados aqui obtidos são úteis para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético e de engenharia genômica do pinhão manso voltadas para a tolerância à salinidade.

## REFERÊNCIAS

- ABOBATTA, W. F. Plant Responses and Tolerance to Extreme Salinity: Learning from Halophyte Tolerance to Extreme Salinity. In: **Salt and Drought Stress Tolerance in Plants**. Springer, Cham, 2020. p. 177-210. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-40277-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-030-40277-8_7)
- ACOSTA-MOTOS, J. R. et al. Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. **Agronomy**, v. 7, n. 1, p. 18, 2017. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010018>
- AHMAD, R. et al. Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in plants under salt stress. In: **Plant Abiotic Stress Tolerance**. Springer, Cham, 2019. p. 191-205. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-06118-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-06118-0_8)
- ALMEIDA, L. M. et al. *Jatropha curcas* L. Latex Production, Characterization, and Biotechnological Applications. In: **Jatropha, Challenges for a New Energy Crop**. Springer, Singapore, 2019. p. 437-459. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3104-6\\_21](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3104-6_21)
- ANAYA, M. L. A. et al. Sex expression and floral diversity in *Jatropha curcas*: a population study in its center of origin. **PeerJ**, v. 4, p. e2071, 2016. <https://doi.org/10.7717/peerj.2071>
- BEKALU, Y.; FEKAD, M. Review on economic importance of *Jatropha* apart from its use as a biofuel. **EPRA International Journal of Research and Development**. v. 5, n. 1, p. 24-33, 2020. <https://doi.org/10.36713/epra2016>
- BERNSTEIN, N. Plants and salt: Plant response and adaptations to salinity. In: **Model Ecosystems in Extreme Environments**. Academic Press, 2019. p. 101-112. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812742-1.00005-2>
- BUTCHER, K. et al. Soil salinity: A threat to global food security. **Agronomy Journal**, v. 108, n. 6, p. 2189-2200, 2016. <https://doi.org/10.2134/agronj2016.06.0368>
- CARDOSO, P. M. R. et al. Genetic evaluation and selection in *Jatropha curcas* L. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 192-199, 2018. <https://doi.org/10.1590/1984-70332018v18n2a27>
- CARNEIRO, A. S. et al. Genetic diversity and population structure in *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) based on molecular markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, p. 1-10, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01224-2>
- CARPENTER, E. J. et al. Access to RNA-sequencing data from 1,173 plant species: The 1000 Plant transcriptomes initiative (1KP). **Giga Science**, v. 8, n. 10, p. giz126, 2019. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz126>

- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant molecular biology reporter**, v. 11, n. 2, p. 113-116, 1993. <https://doi.org/10.1007/BF02670468>
- CAVALCANTE, N. B.; SANTOS, A. D. C.; ALMEIDA, J. R. G. S. The genus *Jatropha* (Euphorbiaceae): A review on secondary chemical metabolites and biological aspects. **Chemico-Biological Interactions**, v. 318, p. 108976, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.108976>
- CONTRAN, N. et al. State-of-the-art of the *Jatropha curcas* productive chain: from sowing to biodiesel and by-products. **Industrial crops and products**, v. 42, p. 202-215, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.037>
- DAHMER, N.; WITTMANN, M. T. S.; DIAS, L. A. S. Chromosome numbers of *Jatropha curcas* L.: an important agrofuel plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, n. 4, 2009. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v09n04a14>
- DEINLEIN, U. et al. Plant salt-tolerance mechanisms. **Trends in plant science**, v. 19, n. 6, p. 371-379, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.02.001>
- DINNENY, J. R. Developmental responses to water and salinity in root systems. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 35, p. 239-257, 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062949>
- FOX, A. R.; MAISTRIAUX, L. C.; CHAUMONT, F. Toward understanding of the high number of plant aquaporin isoforms and multiple regulation mechanisms. **Plant Science**, v. 264, p. 179-187, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.07.021>
- GARG, R.; JAIN, M. RNA-Seq for transcriptome analysis in non-model plants. In: **Legume Genomics**. Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 43-58. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-613-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-613-9_4)
- GENIZA, M.; JAISWAL, P. Tools for building de novo transcriptome assembly. **Current Plant Biology**, v. 11, p. 41-45, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2017.12.004>
- GONZÁLES, N. F. C. International experiences with the cultivation of *Jatropha curcas* for biodiesel production. **Energy**, v. 112, p. 1245-1258, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.06.073>
- HA, J. et al. Genome sequence of *Jatropha curcas* L., a non-edible biodiesel plant, provides a resource to improve seed-related traits. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 2, p. 517-530, 2019. <https://doi.org/10.1111/pbi.12995>
- HAN, Y. et al. A sodium transporter HvHKT1; 1 confers salt tolerance in barley via regulating tissue and cell ion homeostasis. **Plant and Cell Physiology**, v. 59, n. 10, p. 1976-1989, 2018. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy116>

HANIN, M. et al. New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1787, 2016.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01787>

HE, X. et al. Wheat V-H<sup>+</sup>-ATPase subunit genes significantly affect salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 9, n. 1, 2014.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086982.g001>

HELLER, J. **Physic nut (*Jatropha curcas* L.)**. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 1. IBPGR 161. Roma, IBPGR, 1996. 66p. ISBN – 92-9043-28-0.

HERNÁNDEZ, J. A. Salinity tolerance in plants: Trends and perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 1-8, 2019.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20102408>

HERRERA, J. M. et al. Comparative extraction of *Jatropha curcas* L. lipids by conventional and enzymatic methods. **Food and Bioproducts Processing**, v. 118, p. 32-39, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.08.013>

HMIDI, D. et al. Investigation of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> Transport in Halophytes: Functional Analysis of the HmHKT2; 1 Transporter from *Hordeum maritimum* and Expression under Saline Conditions. **Plant and Cell Physiology**, v. 60, n. 11, p. 2423-2435, 2019. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz136>

HRDLICKOVA, R.; TOLOUE, M.; TIAN, B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 8, n. 1, p. e1364, 2017.  
<https://doi.org/10.1002/wrna.1364>

ISAYENKOV, S. V.; MAATHUIS, F. JM. Plant salinity stress: many unanswered questions remain. **Frontiers in plant science**, v. 10, n. 80, p. 1-11, 2019.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>

KAMEL, D. A. et al. Smart utilization of jatropha (*Jatropha curcas* Linnaeus) seeds for biodiesel production: Optimization and mechanism. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 407-413, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.029>

KATAGI, A. et al. Inhibitory effect of isoamericanol A from *Jatropha curcas* seeds on the growth of MCF-7 human breast cancer cell line by G2/M cell cycle arrest. **Heliyon**, v. 2, n. 1, p. e00055, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2015.e00055>

KUKURBA, K. R.; MONTGOMERY, S. B. RNA sequencing and analysis. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2015, n. 11, p. pdb. top084970, 2015.  
<https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>

KUMAR, V. et al. ROS-induced signaling and gene expression in crops under salinity stress. In: **Reactive oxygen species and antioxidant systems in plants: role and regulation under abiotic stress**. Springer, Singapore, 2017. p. 159-184.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_7)

LAVIOLA, B. G. et al. Strategies in the Genetic Breeding of *Jatropha curcas* for Biofuel Production in Brazil. In: ***Jatropha, Challenges for a New Energy Crop***. Springer, Singapore, 2019. p. 45-62. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3104-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3104-6_3)

LEEBENS-MACK et al. One thousand plant transcriptomes and the phylogenomics of green plants. **Nature**, v. 574, n. 7780, p. 679, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1693-2>

LI, P. et al. Comparing the normalization methods for the differential analysis of Illumina high-throughput RNA-Seq data. **BMC bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 347, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0778-7>

LI, S. et al. MsPIP2; 2, a novel aquaporin gene from *Medicago sativa*, confers salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 165, p. 39-52, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.05.020>

LIANG, W. et al. Plant salt-tolerance mechanism: A review. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 495, n. 1, p. 286-291, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.043>

LIU, J. et al. Tissue-specific regulation of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transporters explains genotypic differences in salinity stress tolerance in rice. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 1361, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01361>

MAES, W. H. et al. Plant–water relationships and growth strategies of *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. **Journal of Arid Environments**, v. 73, n. 10, p. 877-884, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.04.013>

MANSOUR, M. M. F. The plasma membrane transport systems and adaptation to salinity. **Journal of plant physiology**, v. 171, n. 18, p. 1787-1800, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.08.016>

MANSOUR, M. M. F.; SALAMA, K. H. A. Cellular mechanisms of plant salt tolerance. In: **Microorganisms in Saline Environments: Strategies and Functions**. Springer, Cham, 2019. p. 169-210. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-18975-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-18975-4_8)

MARTIN, J. A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 10, p. 671-682, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrg3068>

MARTIN, L. et al. Catalyzing plant science research with RNA-seq. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 66, 2013. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00066>

MARZOUK, O. A. *Jatropha curcas* as Marginal Land Development Crop in the Sultanate of Oman for Producing Biodiesel, Biogas, Biobriquettes, Animal Feed, and Organic Fertilizer. **Reviews in Agricultural Science**, v. 8, p. 109-123, 2020. [https://doi.org/10.7831/ras.8.0\\_109](https://doi.org/10.7831/ras.8.0_109)

- MAZUMDAR, P. et al. An update on biological advancement of *Jatropha curcas* L.: New insight and challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 91, p. 903-917, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.082>
- MCGAUGHEY, S. A. et al. Regulating root aquaporin function in response to changes in salinity. **Annual Plant Reviews online**, p. 381-416, 2018. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0626>
- MONTES, J. M.; MELCHINGER, A. E. Domestication and Breeding of *Jatropha curcas* L. **Trends in plant science**, v. 21, n. 12, p. 1045-1057, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.008>
- MUCHATE, N. S. et al. Plant salt stress: adaptive responses, tolerance mechanism and bioengineering for salt tolerance. **The Botanical Review**, v. 82, n. 4, p. 371-406, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12229-016-9173-y>
- NIKALJE, G. C. et al. Temporal and spatial changes in ion homeostasis, antioxidant defense and accumulation of flavonoids and glycolipid in a halophyte *Sesuvium portulacastrum* (L.) L. **PLoS one**, v. 13, n. 4, p. e0193394, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193394>
- OZSOLAK, F.; MILOS, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature reviews genetics**, v. 12, n. 2, p. 87-98, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrg2934>
- PECINA-QUINTERO, V. et al. Genetic structure of *Jatropha curcas* L. in Mexico and probable centre of origin. **Biomass and Bioenergy**, v. 60, p. 147-155, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.11.005>
- PILOTO-RODRÍGUEZ, R. et al. An approach to the use of *Jatropha curcas* by-products as energy source in agroindustry. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, p. 1-21, 2020. <https://doi.org/10.1080/15567036.2020.1749192>
- RAI, M. F. et al. Advantages of RNA-seq compared to RNA microarrays for transcriptome profiling of anterior cruciate ligament tears. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 1, p. 484-497, 2017. <https://doi.org/10.1002/jor.23661>
- RAMOS, P. A. R. et al. Life cycle assessment of biodiesel from *Jatropha curcas* L. oil. A case study of Cuba. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, p. 1-9, 2018. <https://doi.org/10.1080/15567036.2018.1487479>
- RAMPADARATH, S.; PUCHOOA, D.; JEEWON, R. *Jatropha curcas* L.: Phytochemical, antimicrobial and larvicidal properties. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 10, p. 858-865, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.01.019>

- REAL, N. C. et al. Tolerance to salinity in *Jatropha curcas* are genotype-dependent. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 22169-22199, 2019. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n10-347>
- ROBERTSON, G. et al. *De novo* assembly and analysis of RNA-seq data. **Nature methods**, v. 7, n. 11, p. 909-912, 2010. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1517>
- ROMERO, I. G. et al. RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification. **BMC biology**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2014. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-42>
- SAFDAR, H. et al. A review: impact of salinity on plant growth. **Nature and Science**, v. 17, n. 1, p. 34-40, 2019. <https://doi.org/10.7537/marsnsj170119.06>
- SAPETA, H. et al. Drought stress response in *Jatropha curcas*: growth and physiology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 85, p. 76-84, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.08.012>
- SAPETA, H. et al. Transcriptomics and physiological analyses reveal co-ordinated alteration of metabolic pathways in *Jatropha curcas* drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 845-860, 2016. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv499>
- SHABALA, S.; MACKAY, A. Ion transport in halophytes. In: **Advances in botanical research**. Academic Press, 2011. p. 151-199. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387692-8.00005-9>
- SHAHZAD, B. et al. Plant responses and tolerance to salt stress. **Approaches for enhancing abiotic stress tolerance in plants**. Taylor & Francis, p. 61-77, 2019. <https://doi.org/10.1201/9781351104722-3>
- SILVA, E. N. et al. Contrasting physiological responses of *Jatropha curcas* plants to single and combined stresses of salinity and heat. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 1, p. 159-169, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9287-3>
- SIMONEAU, J.; SCOTT, M. S. *In silico* analysis of RNA-seq requires a more complete description of methodology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 8, p. 451-452, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0137-z>
- SINGH, R. K. et al. Versatile roles of aquaporin in physiological processes and stress tolerance in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 149, p. 178-189, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.009>
- SOUZA, M. C. P. et al. RNA-Seq transcriptome analysis of *Jatropha curcas* L. accessions after salt stimulus and unigene-derived microsatellite mining. **Industrial Crops and Products**, v. 147, p. 112168, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112168>

STARK, R.; GRZELAK, M.; HADFIELD, J. RNA sequencing: the teenage years. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 11, p. 631-656, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0150-2>

SUDHAGAR, A.; KUMAR, G.; EL-MATBOULI, M. Transcriptome analysis based on RNA-Seq in understanding pathogenic mechanisms of diseases and the immune system of fish: a comprehensive review. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 245, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19010245>

SUN, Huayu et al. The bamboo aquaporin gene PeTIP4; 1–1 confers drought and salinity tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Plant cell reports**, v. 36, n. 4, p. 597-609, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2106-3>

TANVEER, M.; AHMED, H. A. I. ROS Signalling in Modulating Salinity Stress Tolerance in Plants. In: **Salt and Drought Stress Tolerance in Plants**. Springer, Cham, 2020. p. 299-314. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-40277-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-40277-8_11)

ULFAT, M. et al. RNAseq Analysis Reveals Altered Expression of Key Ion Transporters Causing Differential Uptake of Selective Ions in Canola (*Brassica napus* L.) Grown under NaCl Stress. **Plants**, v. 9, n. 7, p. 891, 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9070891>

VERK, M. C. V. et al. RNA-Seq: revelation of the messengers. **Trends in plant science**, v. 18, n. 4, p. 175-179, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.02.001>

VIRGENS, I. O. et al. Revisão: *Jatropha curcas* L.: aspectos morfofisiológicos e químicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, p. 1-11, 2017. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.3016>

VOLKOV, V.; BEILBY, M. J. Salinity tolerance in plants: Mechanisms and regulation of ion transport. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1795, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01795>

WANG, P. et al. Genome-Wide Screening and Characterization of the Dof Gene Family in Physic Nut (*Jatropha curcas* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1-15, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19061598>

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>

WU, J.; ZHANG, J. Research and Development of Natural Vegetable Insulating Oil Based on *Jatropha curcas* Seed Oil. **Energies**, v. 13, n. 17, p. 4319, 2020. <https://doi.org/10.3390/en13174319>

YAO, L. et al. Transcriptome sequencing and comparative analysis of differentially-expressed isoforms in the roots of *Halogeton glomeratus* under salt stress. **Gene**, v. 646, p. 159-168, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.12.058>

YOUSEFIRAD, S. et al. The RNA-seq transcriptomic analysis reveals genes mediating salt tolerance through rapid triggering of ion transporters in a mutant

barley. **Plos one**, v. 15, n. 3, p. e0229513, 2020.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229513>

ZAINUDIN, A. et al. The potential of physic nut (*Jatropha curcas* Linn.) hybrid plant as a source of biodiesel at different planting location for dry land utilization. **Energy Reports**, v. 6, p. 921-926, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2019.12.006>

ZHANG, L. et al. Global analysis of gene expression profiles in physic nut (*Jatropha curcas* L.) seedlings exposed to salt stress. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e97878, 2014.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097878>

ZELM, E. V.; ZHANG, Y; TESTERINK, C. Salt tolerance mechanisms of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 71, p. 1-31, 2020.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100005>

ZHANG, Z. H. et al. A comparative study of techniques for differential expression analysis on RNA-Seq data. **Plos one**, v. 9, n. 8, p. e103207, 2014.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103207>

ZHAO, C. et al. Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity. **The Innovation**, v. 1, n. 1, p. 100017, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2020.100017>

ZHAO, L. et al. Analysis of transcriptome and epitranscriptome in plants using PacBio Iso-Seq and nanopore-based direct RNA sequencing. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 253, 2019. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00253>