

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Abordagem fisiológica e molecular da capacidade
de tolerância à seca de *Jatropha curcas* L.: uma
planta resistente à seca**

Tiago Miguel Castelo Dias Cruz

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Abordagem fisiológica e molecular da
capacidade de tolerância à seca de *Jatropha
curcas* L.: uma planta resistente à seca**

Tiago Miguel Castelo Dias Cruz

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada pela Doutora Margarida Oliveira e pela Doutora
Deodália Dias

2010

Agradecimentos

Agradeço às minhas orientadoras Professora Doutora Deodália Dias e Professora Doutora Margarida Oliveira pelo apoio, dedicação, disponibilidade e amizade, tornando possível a realização deste trabalho. Peço desculpa por ter causado algum cabelo branco a mais;

Ao Miguel Costa, do Laboratório de Ecofisiologia Molecular de Plantas, pela amizade, disponibilidade, e por toda a ajuda prestada com o IRGA;

Ao Nelson Saibo (GPlantS), pela ajuda na construção dos primers degenerados, pela amizade, disponibilidade, e por todo o apoio prestado durante a realização deste trabalho;

Ao Tiago Lourenço (GPlantS), pela amizade, dedicação, apoio, pelas discussões científicas, e por tudo o que me ensinou durante a realização deste trabalho, que fazem de mim hoje um melhor Biólogo. Só é pena teres mau gosto futebolístico, mas enfim...;

À Helena Sapeta (GPlantS), por ter sido durante este trabalho o meu braço direito e muitas vezes o esquerdo. Por todo o todo o apoio, dedicação, disponibilidade, amizade, por teres sido às vezes quase minha mãe, e mais uma série de membros da família, o meu muito obrigado;

A todos os restantes elementos do Grupo Genómica de Plantas em Stress (GPlantS). Ao Duarte, Diego, André, Tânia, Cecília, Inês, Pedro, Nuno, Mafalda, Milene, Liliana, Isabel, Sam, Subhash, Sónia, Ana Paula Farinha, Ana Paula Santos, Ana Margarida, os melhores colegas de laboratório, que criam um ambiente espectacular e que me fizeram sentir em casa durante estes meses;

A toda a minha família, em particular aos meus pais, por colocarem sempre os meus interesses em primeiro lugar e por todos os sacrifícios que fizeram e fazem por mim, o meu profundo agradecimento. Adoro-vos;

Aos meus amigos, por todo o apoio e confiança em mim, demonstrados ao longo destes meses; e pela motivação que me deram. Obrigado malta!;

A todos aqueles que por diferentes razões possibilitaram a realização deste trabalho, muito obrigado;

Em homenagem ao meu irmão, pela tese dele que infelizmente nunca vou poder ver. Ias tirar um 20 de certeza.

Índice

Agradecimentos.....	II
Abreviaturas e símbolos	VI
Resumo.....	IX
Abstract.....	X
1 Introdução	1
1.1 <i>Jatropha curcas</i> L.	1
1.1.1 História	1
1.1.2 Botânica	1
1.1.3 Importância económica de <i>Jatropha curcas</i> L.	3
1.2 Seca, stress hídrico e melhoramento vegetal.....	4
1.2.1 Definição de seca: O que é a seca?	4
1.2.2 Seca e stress hídrico	4
1.2.3 Selecção e melhoramento	5
1.3 Relações hídricas e resposta ao stress hídrico	6
1.3.1 Relação entre a água e as plantas.....	6
1.3.2 Mecanismos de resposta ao stress hídrico	7
2 Objectivos	18
3 Materiais e métodos	19
3.1 Material vegetal e condições experimentais.....	19
3.2 Ensaio de stress hídrico.....	19
3.3 Análise de expressão génica.....	20
3.3.1 Recolha das amostras	20
3.3.2 Extracção de RNA total de <i>Jatropha curcas</i> L.	20
3.3.3 Quantificação do RNA total.....	21

3.3.4 Síntese de cDNA	21
3.3.5 Amplificação dos genes em estudo descritos na literatura	21
3.3.6 Isolamento de genes de <i>Jatropha curcas</i> L. relacionados com stress	22
3.4 Análise fisiológica	28
3.4.1 Recolha das amostras	28
3.4.2 Medições estomáticas	28
3.4.3 Teor foliar relativo de água (RWC)	29
3.4.4 Quantificação do teor de clorofila	29
3.4.5 Densidade estomática	30
3.4.6 Tamanho das raízes e peso seco.....	30
3.4.7 Análise morfológica das plantas.....	30
3.5 Análise estatística	30
4 Resultados.....	32
4.1 Identificação e isolamento das sequências dos genes putativos <i>ABI</i> , <i>ABF1,2</i> e de <i>T6PS</i>	32
4.2 Isolamento das sequências 3'RACE e 5'RACE dos genes <i>ABI</i> , <i>ABF1,2</i> e de <i>T6PS</i>	34
4.3 Estudo de expressão génica	35
4.4 Estudo de aspectos morfo-fisiológicos de <i>Jatropha curcas</i> L.....	38
4.4.1 Dados obtidos por IRGA.....	38
4.4.2 Dados morfológicos.....	42
4.4.3 Dados de RWC , densidade estomática, tamanho das raízes, peso seco, e de teor de clorofila	45
5 Discussão.....	46
5.1 Identificação e isolamento dos genes putativos <i>ABI</i> , <i>ABF 1 e 2</i> , e <i>T6PS</i> de <i>Jatropha curcas</i> L.	46
5.2 Estudo de expressão génica	47
5.3 Estudo de dados fisiológicos	50

5.4 Estudo dos dados morfológicos	52
6 Conclusões e Perspectivas Futuras.....	54
7 Referências Bibliográficas.....	56
8 Anexos	64

Abreviaturas e símbolos

%	Porcentagem
°C	Graus célcus
φ PSII	Eficiência do fotossistema II
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
μmol	micromole
A	Taxa de fotossíntese
ABA	Ácido abcísico
ABF1	ABA factor de ligação 1 (ABA binding factor 1)
ABF2	ABA factor de ligação 2 (ABA binding factor 2)
ABF3	ABA factor de ligação 3 (ABA binding factor 3)
ABF4	ABA factor de ligação 4 (ABA binding factor 4)
ABI	Ácido abcísico insensível (Acid abscisic insensitive)
ABRE	Elemento de resposta a ABA (ABA responsive element)
AP2	APETALLA2
C3	Via de fixação fotossintética do carbono em que o produto da reacção de carboxilação é um composto com três átomos de carbono (ácido fosfoglicérico)
C4	Via de fixação fotossintética do carbono em que o produto da reacção de carboxilação é um composto com quatro átomos de carbono
CAM	Metabolismo ácido das crassulácias
Ca²⁺	Ião cálcio
CBF1	Factor de ligação à repetição C 1 (C-repeat binding protein 1)
CBF2	Factor de ligação à repetição C 2 (C-repeat binding protein 2)

CBF3	Factor de ligação à repetição C 3 (C-repeat binding protein 3)
cDNA	DNA complementar
Ci	Concentração interna de dióxido carbono
cm	centímetros
CO₂	Dióxido de Carbono
Colony-PCR	PCR realizado em colónia bacteriana
CRT	Repetição de C (C repeat)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRE	Elemento de resposta à seca (Drought responsive element)
DREB	Factor de ligação ao DRE (DRE-binding)
E	Transpiração foliar
EREB	Elemento de ligação que responde ao etileno (Ethylen responsive element binding)
ERF	Factor de resposta ao etileno (Ethylen responsive factor)
FT	Factor de transcrição
g	Gramma
Kg	Quilograma
gs	Condutância estomática
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de oxigénio
IRGA	Analisador de gás por infra vermelhos (Infra Red Gas Analyzer)
MCS	Local de clonagem multipla (Multiple Cloning Site)
Mg²⁺	Ião magnésio
ml	mililitro
mM	milimolar

mmol	milimole
Mn²⁺	Ião manganês
NH₄⁺	Amónio
PA	Ácido fosfatídico
Pb	Pares de base
PCR	Reacção de polimerase em cadeia
PEG	Polietilenoglicol
PIP	Proteína intrínseca da membrana plasmática
PIP1	Proteína intrínseca da membrana plasmática 1
PIP2	Proteína intrínseca da membrana plasmática 2
PLD	Fosfolipase D
PP2C	Fosfatase 2C
PPM	Fosfatase de proteína M
PPP	Fosfatase de proteína P
PSII	Fotossistema II
ROS	Espécies reactivas de oxigénio (Reactive oxygen species)
RT-PCR	PCR de transcriptase inversa
RWC	Teor relativo de água foliar
SIP	Proteína intrínseca pequena e básica
T6P	Trealose-6-fosfato
T6PS	Trealose-6-fosfato sintetase
T6PP	Trealose-6-fosfato fosfatase
TIF	Proteína intrínseca do tonoplasto
U	Unidade
WUE	Eficiência do uso de água (Water use efficiency)

Resumo

A seca afecta as plantas, originando-lhes stress. Para o Homem, como as culturas agrícolas fornecem 2/3 do alimento da população mundial, este problema pode provocar graves consequências do ponto de vista da saúde pública. As plantas desenvolveram mecanismos de resposta à seca, que podem ser regulados pela expressão de diversos genes, que permitem à planta adaptar-se a novas condições ambientais.

A planta *Jatropha curcas* L. possui grande capacidade de adaptação a condições de seca, o que poderá dever-se a numerosos factores.

Este trabalho teve como objectivo monitorizar alterações de expressão génica em genes já anteriormente correlacionados com a tolerância à seca, seja em *Jatropha* ou noutras plantas modelo, utilizando para o efeito duas linhas de *J. curcas* L.. Estas linhas são originárias de ambientes com regimes hídricos diferentes, seco *versus* tropical húmido. As alterações detectadas ao nível da expressão transcricional foram correlacionadas com ensaios morfo-fisiológicos efectuados nas duas variedades de *J. curcas*, com vista à caracterização do seu comportamento sob stress hídrico.

Concluiu-se que as duas linhas de *J. curcas* L., sob stress hídrico, possuem uma resposta semelhante ao nível da expressão génica. Foi também possível verificar neste trabalho que as duas linhas de *J. curcas* L., submetidas ao mesmo stress, apresentam um comportamento morfo-fisiológico diferente. A linha de regime hídrico seco demonstra um ritmo de crescimento lento mas constante e um melhor aproveitamento da água disponível, em contraste com a linha de regime tropical húmido que mostra um crescimento rápido, interrompido por stress hídrico. Parece ainda haver alguma correlação entre a expressão de alguns genes e alterações morfológicas nas linhas de *J. curcas* L.. Os resultados obtidos apontam para eventuais estratégias diferentes entre as duas linhas de *J. curcas* L. relativamente à forma de lidar com o stress hídrico, embora os ensaios realizados não tenham permitido verificar uma expressão génica discriminante.

Palavras-chave: *Jatropha curcas* L., seca, saúde pública, expressão génica, ensaios morfo-fisiológicos

Abstract

Drought affects plants, causing stress. For mankind, to whom crops represent 2/3 of world food reserves, this problem can cause several issues related to human health. Plants have evolved mechanisms to cope with stress, which can be regulated through different genes, helping the plant in its adaptation to the new environmental conditions.

Jatropha curcas L. is a plant that is able to survive in extreme drought environments, which may be due to a great number of causes.

The goal of this work was to monitor gene expression changes from already known drought-responsive genes, in *Jatropha* or in other model plants. For this purpose, we used two lines of *J. curcas* L., which have their origin in two different hydrologic regimes (arid *versus* tropical). Gene expression changes were correlated to physiological and morphological tests under drought in the two *J. curcas* L. lines, in order to have new insights in how this plant species deal with drought.

With this work, we could conclude that both lines under drought stress have a similar gene expression pattern. We could also conclude that the two *J. curcas* L. lines have a different physiological and morphological response under drought stress. The arid line shows a slow but constant growth rate and a good water usage. In the opposite direction, the tropical line shows to have a bigger growth rate, although it is impaired under drought. There seems to be a correlation between morphological and expressions of some genes in *Jatropha curcas* lines. Our results support an eventual different strategy among the ecotypes to cope with drought stress, although we could not observe a discriminating gene expression pattern.

Keywords: *Jatropha curcas* L., drought, human health, gene expression, morpho-physiological studies

1 Introdução

1.1 *Jatropha curcas* L.

1.1.1 História

A *Jatropha curcas* L. é uma espécie herbácea, pertencente à da família das Euforbiaceas. Actualmente, esta planta encontra-se disseminada por diferentes partes do mundo, no entanto admite-se que a sua origem esteja localizada na América Central, em particular no México.

O nome *Jatropha curcas* L. tem origem nas palavras gregas “jatos” (doutor) e “trophé” (alimento), o que implica uma origem medicinal para o seu uso. Devido à sua distribuição abrangente, possui vários nomes em diferentes partes do globo, sendo popularmente conhecida por “physic nut” ou “purging nut” (Inglaterra), pinhão-manso (no Brasil), “tempate” (Honduras e El Salvador), “pignon d’Inde”, “purghere” (França), “kadam” (Nepal), “yu-lu-tzu” (China), “mupuluka” (Angola) e purgueira em Portugal.

Admite-se que tenham sido os portugueses, o primeiro povo a trazer a planta para o continente africano, primeiro para Cabo Verde, e posteriormente para o resto de África e para a Ásia. Em abono desta teoria, encontramos os primeiros registos de aplicações comerciais da planta, datados do século XVIII, em Lisboa, para onde os navegadores traziam o óleo da planta e o entregavam às indústrias de produção de sabão e de óleo para lâmpadas (Heller, 1996).

1.1.2 Botânica

A *Jatropha curcas* L. é uma espécie resistente à seca, que se desenvolve até uma altura máxima de 5/6 metros. Trata-se de uma planta com uma grande capacidade de adaptação a climas áridos, o que lhe permite crescer nos mais diversos ambientes, inclusive em solo rochoso. Os únicos tipos de solos que não suporta são aqueles que possuam elevadas concentrações de água ou que tenham uma fraca capacidade de drenagem.

Possui um crescimento articulado, com uma morfologia descontinuada a cada extensão. Durante o seu crescimento desenvolve normalmente uma raiz central bem

definida, e com 4 ou 5 raízes periféricas. Tem um período de vida de cerca de 50 anos.

É uma planta de folha caduca em que a queda das suas folhas ocorre durante o Inverno, devido ao frio, ou na estação seca, de forma a reduzir as perdas de água por transpiração. As folhas têm um crescimento alternado, possuem entre 6 a 15cm, tendo a maioria 7 lóbulos, e os estomas estão presentes em maior quantidade na face abaxial (Kumar *et al.*, 2008). O seu caule e os seus ramos possuem grandes quantidades de látex.

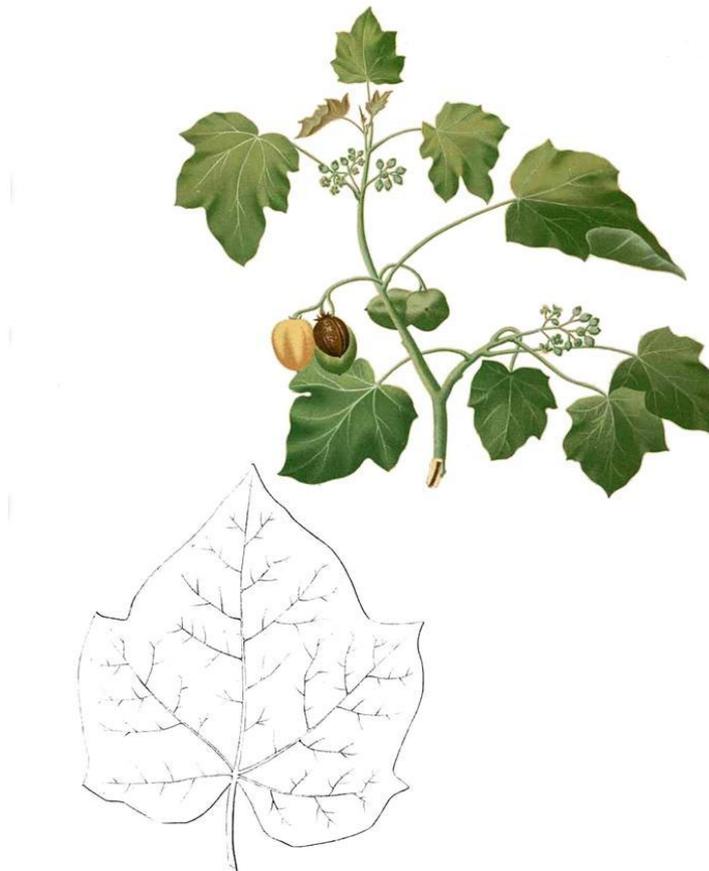


Figura 1. Representação esquemática de *Jatropha curcas* L. (Figura adaptada de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Jatropha_curcas_Blanco2.384.png)

Durante a floração, *Jatropha curcas* L. apresenta as suas inflorescências na extremidade dos ramos. As flores são unisexuais, apresentando em alguns casos flores hermafroditas. A planta apresenta polinização cruzada, excepto nos casos das flores hermafroditas, em que pode ocorrer auto-polinização (Heller, 1996).

Uma das principais características da purgueira é a sua grande capacidade de resistir a longos períodos de seca e de crescer em solos pouco férteis (Kumar, 2008; Achten, 2008, Openshaw, 2000). Foram realizados vários estudos que comprovam que esta característica para resistir a longos períodos de seca, em diferentes fases do desenvolvimento (Kheira, 2009; Maes, 2009).

1.1.3 Importância económica de *Jatropha curcas* L.

Jatropha curcas tem múltiplas utilizações, sendo utilizada em aplicações industriais, bem como ao nível das comunidades locais. Na indústria, o óleo retirado da semente é bastante procurado para a produção de biodiesel (Kumar *et al.*, 2008; Openshaw, 2000). Apesar de o seu custo de produção ser muito reduzido, quando comparado com outras plantas produtoras de biodiesel, ainda existe alguma discussão sobre o verdadeiro potencial do biodiesel de *Jatropha curcas* (Achten *et al.*, 2008). Para além dos fins energéticos, o óleo extraído tem outras aplicações industriais, tais como a produção de cosméticos, em que se utilizam alguns dos subprodutos da produção do biodiesel (Kumar, 2008; Achten, 2008).

Ao nível das comunidades locais, as folhas de *Jatropha curcas* são utilizadas como alimento pelas populações mais pobres, embora tenha de ser alvo de vários processos de confecção devido a ter compostos tóxicos. Muitas populações tiram partido desta toxicidade para construir sebes naturais, de forma a separar os terrenos agrícolas de terrenos utilizados para a pastorícia, assim como para a produção de pesticidas (Kumar, 2008).

1.2 Seca, stress hídrico e melhoramento vegetal

1.2.1 Definição de seca: O que é a seca?

Um estado de seca pode ser definido como um longo período de exposição a um tempo seco, com duração suficiente para causar graves problemas no balanço hídrico de uma região, coadjuvado por outros factores climáticos. De entre todos os fenómenos naturais, a seca é o mais complexo, e também o que causa maiores prejuízos, embora seja aquele em que não existe consenso, entre a comunidade científica, no que respeita à sua classificação (Wilhite, 1993).

Os estados de seca diferem entre si pela sua duração, intensidade, e pela área que afectam. A duração de um estado de seca pode variar, sendo que normalmente é necessário um período de 2-3 meses para se considerar um estado de seca, embora tal se possa prolongar por vários anos (Wilhite, 1993). A intensidade de um estado de seca é medida com base em diferentes padrões, cada um deles com um conceito básico de funcionamento, e que está relacionado com a duração do mesmo (Byun *et al.*, 1999). A área afectada pelo estado de seca é proporcional à sua duração, e pode ser variável, embora as áreas de maior incidência mudem entre as épocas secas de cada ano (Wilhite, 1993).

1.2.2 Seca e stress hídrico

Prevê-se que as situações de seca extrema sejam cada vez mais frequentes e duradouras. A nível mundial, estas situações estão associadas aos fenómenos de alteração climática, que têm tornado os fenómenos meteorológicos cada vez mais extremos (Easterling *et al.*, 2000; Nicholls, 2004; McMichael *et al.*, 2006). Um aumento da frequência e incidência da situação de seca vai resultar na falta de água (em quantidade e qualidade), em baixas produções agrícolas e, conseqüentemente, em situações de fome ou má nutrição nas populações mais pobres.

Do ponto de vista económico, esta situação é muito grave, principalmente nas economias que têm uma forte aposta na agricultura, como a americana, onde se estima que só a grande seca de 1988-1989 tenha tido um impacto na ordem dos 39 mil milhões de dólares (Easterling *et al.*, 2000).

Do ponto de vista da saúde humana, os problemas originados pela seca têm um efeito imediato nas populações de países mais pobres e menos desenvolvidos, como o crescimento das taxas de morbidade e de mortalidade, e o aumento da má nutrição, principalmente nas crianças. Nas últimas décadas, este problema tem ocorrido principalmente na África subsaariana, onde já se verificaram grandes períodos de seca (Glantz, 1988; Olsson, 1993) com consequências graves nas populações. Em outras regiões de África, e ainda alguns países asiáticos (ex: Índia, China), cujos campos de cultivo já se encontram numa situação de stress elevado, estão entre os mais vulneráveis para que este tipo de situações (Platz, 2002).

Devido a este problema, e contribuindo para as taxas de mortalidade e de morbidade, surgem diversos problemas de saúde, nomeadamente, doenças oportunistas que se desenvolvem, ou que têm um desenvolvimento facilitado devido à má nutrição, como a SIDA (Mason *et al.*, 2007; de Waal e Whiteside, 2003), e à ingestão deficiente de diferentes grupos de nutrientes, como por exemplo, vitaminas, minerais, lípidos e polissacáridos. Estes nutrientes, que estão presentes em grande quantidade nas plantas e têm um papel fundamental na dieta e saúde de muitas populações (Piironen *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 1994; Slavin, 2004). Períodos de seca prolongada reduzem a capacidade produtiva dos solos contribuindo para as situações de má nutrição nas populações (Lal, 2009).

1.2.3 Selecção e melhoramento

Actualmente, a grande maioria das culturas não possui, na sua variabilidade genotípica natural, genes que confirmam tolerância à secura e que possam ser utilizados em programas de melhoramento convencionais. Por isso, nos últimos anos, através de estratégias de engenharia genética, têm-se procurado genes que possam conferir tolerância à secura nas diferentes culturas. Desta forma, pretende-se manter a produtividade das culturas em situações de stress e reduzir os efeitos da carência nutricional nas populações, bem como todos os problemas subsequentes (Thompson, 2002; Toenniessen *et al.*, 2003).

Este compromisso é difícil, visto que a maioria dos genes de resposta à secura resulta em limitações no crescimento da planta. Assim, e com um conhecimento cada vez maior das diferentes vias de resposta ao stress, procura-se a utilização deste tipo

de genes de forma a aumentar a tolerância à secura, sem bloquear outros processos metabólicos na planta. No entanto, este é um processo difícil, visto que muitas destas vias estão envolvidas em diferentes respostas ao nível celular (Chaves e Oliveira, 2004).

1.3 Relações hídricas e resposta ao stress hídrico

1.3.1 Relação entre a água e as plantas

As plantas, como todos os seres vivos, precisam de água para que o seu metabolismo funcione e para que o seu desenvolvimento ocorra normalmente. Para além disso, o nível hídrico de uma célula influencia a estrutura de muitas proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e ainda outros constituintes de uma célula. A água forma também o ambiente onde muitos processos bioquímicos ocorrem, assim como participa directamente em muitos deles (Taiz e Zeiger, 2002).

Nas células vegetais, a água representa a maioria da massa celular. Cerca de 95% do volume celular, em plantas, é composto pelo vacúolo. Embora nos tecidos condutores, a percentagem de água seja menor, nos tecidos em crescimento a massa total de água chega a ser de 80% a 95%. As sementes, apesar de só possuírem uma percentagem de água baixa (5 a 15%), necessitam de absorver muita água para iniciar o seu processo de germinação (Taiz e Zeiger, 2002).

A presença de uma parede celular, nas células vegetais, permite que estas consigam resistir a grandes pressões hídricas, as pressões de turgor, que resultam do processo hídrico das plantas. Este tipo de pressão é necessário para diferentes processos fisiológicos, para o transporte de solutos no floema, assim como para a rigidez e estabilidade mecânica dos tecidos vegetais não lenhificados (Taiz e Zeiger, 2002).

A absorção de água nas plantas ocorre de uma forma contínua, visto que a maioria da água evapora-se, à medida que se dá a absorção do CO₂ atmosférico, necessário para a fotossíntese. Este processo pode ocorrer por três vias, via apoplasto, via simplasto e via transmembranar. A via apoplasto é feita através dos espaços transmembranares, existentes entre as paredes celulares, e é aquela que transporta mais solutos. A via simplasto é feita através dos plasmodesmos, enquanto que a

transmembranar realiza-se por passagem através das membranas plasmáticas das células, sendo esta a mais relacionada com transporte de água (Steudel e Frensch, 1996).

1.3.2 Mecanismos de resposta ao stress hídrico

1.3.2.1 Trocas gasosas na resposta ao déficit hídrico

As plantas precisam de CO_2 para sobreviver, visto que a sua absorção é necessária para a realização da fotossíntese. Apesar disso, as plantas muitas vezes têm que escolher entre a perda de H_2O e a absorção de CO_2 , o que é modulado pela resistência estomática.

A regulação estomática é controlada pela abertura e fecho dos estomas. Este mecanismo, depende do vapor de água, do CO_2 , e das variações da pressão de turgescência das células de guarda. A regulação da abertura estomática é controlada pelo ácido abscísico, a principal hormona envolvida no fecho estomático, assim como pelas citocininas, para a abertura do estoma (Taiz e Zeiger, 2002).

A regulação deste mecanismo em situações de seca, é promovido pela produção destas hormonas. Estas são produzidas em resposta ao declínio de turgor da folha, a um déficit da pressão de vapor de água na atmosfera, ou ainda à recepção de sinais de seca pelas raízes. Quando activado, o fecho dos estomas leva a uma redução da condutância estomática, um tipo de resposta à seca muito comum quando as plantas se encontram desidratadas (Chaves *et al.*, 2009). Assim, a diminuição da condutância estomática tem, como efeito, a redução da fixação de carbono e das perdas de água, no período em que ocorre o maior déficit de pressão de vapor entre a folha e a atmosfera, dando origem a uma optimização da fixação de carbono, em relação à quantidade de água (Jones, 1998).

A grande variabilidade de climas e de nichos ecológicos à escala terrestre, resultou em diferentes estratégias de fixação fotossintética de CO_2 . As três vias usadas pelas plantas, para executar o processo fotossintético, são designadas de C3, C4 e CAM. As plantas C3 e C4, são aquelas cujo processo fotossintético produz compostos estáveis com 3 e 4 átomos de carbono, respectivamente. As plantas CAM apresentam um mecanismo diferente. Durante o dia produzem malato, e só à noite fixam o CO_2 .

Neste sistema, as plantas abrem os estomas de noite, mantendo-os fechados durante o dia minimizando assim as perdas de água (Taiz e Zieger, 2002).

Situações de déficit hídrico resultam numa redução da taxa fotossintética motivada pelo fecho dos estomas. Com os estomas fechados, o CO₂ deixa de poder entrar para dentro da folha, o que leva a limitar o substrato disponível para o enzima RuBisCo, reduzindo a taxa fotossintética e a assimilação de CO₂ (Chaves *et al.*, 2009). A necessidade de CO₂ nas plantas é regulada em função da disponibilidade deste gás, assim como pelo dos estomas, como demonstram as diferenças na resposta da fotossíntese à concentração interna (C_i) de CO₂ (Tallman, 2004).

Em situação fisiológica normal, as plantas utilizam o máximo de luz para realizar a fotossíntese. Em situação de déficit hídrico, e de forma a evitar a acumulação em excesso de electrões, as plantas adoptaram estratégias morfológicas e de dissipação térmica, para reduzir a quantidade de luz absorvida. Através da fluorescência clorofilina, utilizada como estimador do stress hídrico, é possível verificar que existe uma redução no transporte de electrões pelo fotossistema II em situações de stress hídrico (Baker e Rosenqvist, 2004; Baker, 2008). Esta redução pode ocorrer devido a danos sofridos pelo fotossistema II, ou a uma estratégia utilizada pelas plantas, que passa por uma redução na capacidade do fotossistema II para transportar electrões. Esta redução cria um efeito fotoprotector, que impede o fotossistema II de foto-oxidação, embora reduza a fotossíntese (Yordanov *et al.*, 2000).

1.3.2.2 Adaptações morfológicas das plantas em déficit hídrico

As plantas, durante seu período de vida, estão sujeitas a estados de secura. De um ponto de vista clássico, a resposta das plantas a este tipo de stress abiótico tem sido sempre baseado em evitar, escapar ou tolerar, muitas vezes utilizando os três processos (Chaves *et al.*, 2002).

Para escapar aos efeitos de um período de seca, as plantas procuram minimizar o seu ciclo de vida, de forma a finalizar um ciclo reprodutor. Quando procuram evitar um estado de seca, as plantas optimizam os seus processos de absorção e retenção de água. Podem continuar a desenvolver as suas raízes, de forma a aumentar a área de captação de água, fechar os estomas, mudar os ângulos das folhas, ou até mesmo

perdê-las por inteiro, de forma a minimizar as perdas de água, e a redireccionar os nutrientes para outros locais que estejam mais carenciados (Chaves *et al.*, 2002).

Nas plantas que são tolerantes à secura, ocorreu o desenvolvimento de uma série de mecanismos que lhes permitiu estarem adaptadas para que, perante um estado de seca, activem rapidamente as respostas adequadas. Essa adaptação é diferente entre espécies visto que existem processos adaptativos específicos para as espécies que ocupam nichos ecológicos diferentes. Cada planta possui uma percepção de sinal diferente, assim como uma regulação génica e metabólica diferente, que se reflecte nas diferenças de tolerância à secura entre as espécies (Bartels e Sunkar, 2005).

1.3.2.3 Resposta molecular ao défice hídrico

A recepção de sinais que indicam um défice hídrico, nas plantas, vão activar diversos mecanismos de resposta. Estes mecanismos vão ser processados em diferentes níveis, tendo como objectivo minimizar os danos que este tipo de stress pode provocar na planta.

A intensidade da resposta varia de acordo com a capacidade de percepção do sinal, da transdução desse mesmo sinal, e com a resposta que ocorre ao nível da expressão génica, ou ainda de outros processos metabólicos, que possam ser exclusivos de alguma plantas, como nas que são tolerantes à secura (Bartels e Sunkar, 2005).

A transdução de sinal, que se inicia após a recepção nos diferentes receptores de sinal de secura, ocorre por intermédio de várias famílias de cinases, como as da família MAPK, ou as CDPKs activadas pelo cálcio, induzidas por stress osmótico, assim como por fosfatases e outros transdutores de sinais (Bartels e Sunkar, 2005). Esta cascata de sinais termina com a activação de um padrão de resposta, modulado consoante o estímulo, e que leva à activação ou inactivação de genes de resposta por parte de factores de transcrição (FTs), a modulação da produção de ABA, e a produção de proteínas e de osmoreguladores de efeito protector (Bartels e Sunkar, 2005; Saibo *et al.*, 2009).

1.3.2.3.1 Factores de transcrição

Foram detectados, na planta modelo *Arabipodsis*, mais de 1500 genes que codificam FTs. O elevado número de famílias destas proteínas, é demonstrativo da importância que desempenham nas plantas (Riechmann *et al.*, 2000).

FTs são proteínas que, na sua estrutura, possuem uma região oligomerizada, um local de regulação transcripcional (activação ou repressão), um sinal de localização nuclear, e uma região de ligação ao DNA altamente conservada. Esta última região interage com o elemento *cis* (região nucleotídica conservada para cada tipo de FT), presente no promotor dos genes, de forma a regular a expressão génica. A modulação da ligação dos FTs ao DNA faz-se directamente ou após activação dos FTs, que na maioria dos casos é feita através de alterações pós-traducionais, principalmente fosforilações (Liu *et al.*, 1999).

A indução da expressão de FTs, em plantas, pode ter origem em duas vias, uma dependente de ABA e outra independente. A existência destas duas vias já foi demonstrada, assim como a indução da expressão de FTs pela aplicação exógena de ABA em plantas (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Nestas duas vias, os elementos de regulação *cis* mais importantes são o CRT/DRE, na via ABA independente, e o ABA responsive element (ABRE), na via ABA dependente. O elemento ABRE contém um motivo altamente conservado, PyACGTGGC, presente numa região do promotor dos genes. Este motivo altamente conservado, precisa de ter pelo menos duas cópias de elementos ABRE, para que a transcrição dos genes regulados ocorra. Na via independente do ABA, o elemento CRT/DRE contém o motivo A/GCCGAC, e só necessita de uma cópia para regular a expressão (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2005).

1.3.2.3.1.1 Regulão AREB/ABF

Na via dependente do ABA, uma das famílias de FTs que se liga ao elemento *cis* ABRE é a família AREB/ABF, também conhecida por regulão ABF. Estes FTs são activados quando a planta entra situações de stress de origem abiótico. Os membros deste regulão pertencem à grande família de factores de transcrição bZIP. A família AREB/ABF, composta pelos genes *ABF1*, *ABF2/AREB1*, *ABF3* e *ABF4/AREB2*, possui um domínio bZIP altamente conservado na região C-terminal,

assim como três regiões altamente conservadas, designadas C1, C2 e C3, na região N-terminal. Estas regiões contêm resíduos de serina e treonina, que são alvos de fosforilações (Kim, 2006; Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006). Este facto foi demonstrado para ABF2 e ABF4, por Uno *et al.* (2000) em *Arabidopsis*. Utilizando esta planta modelo, também foi demonstrado que, através da sobre-expressão de ABF3 e ABF4, ocorre um aumento da tolerância das plantas ao frio e à secura, embora os mutantes com origem nas sementes transgênicas tenham problemas de crescimento e haja uma diminuição na taxa de germinação (Kang *et al.*, 2002, Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 2006).

1.3.2.3.1.2 Família ERF

Na via ABA independente, verifica-se a existência de uma família de FTs, ligados à regulação de genes envolvidos na resposta a stress abiótico, que é a Ethylene-responsive-element binding (EREB). Esta família de proteínas, que pertence à grande família APETALLA2 (AP2) e é única em plantas.

Esta família possui um domínio conservado de 58 a 59 aminoácidos, chamado domínio ERF. Este domínio pode ligar-se a dois elementos *cis* diferentes, o elemento CRT/DRE, e um elemento GCC *box*. Esta grande família de FTs está envolvida na regulação de diferentes mecanismos como o desenvolvimento floral ou a resposta a diferentes tipos de stress abiótico, incluindo stress hídrico (Singh *et al.*, 2002). A sobre-expressão de FTs desta família com efeitos na tolerância a stress abiótico já foi efectuada em outras plantas, como *Nicotiana tabacum*, mas apesar de aumentar a tolerância à secura, as plantas apresentavam efeitos secundários adversos (Park *et al.*, 2001). Em *Jatropha curcas*, foi recentemente descrito um membro desta família que, num ensaio de sobre-expressão em *Arabidopsis*, relevou um aumento da tolerância numa situação de stress hídrico (Tang *et al.*, 2007).

1.3.2.3.1.3 Regulão CBF/DREB

Pela via independente do ABA, também activada por stress abiótico, a família de FTs mais conhecida é a C-repeat binding protein/DRE-binding (CBF/DREB), que se liga ao elemento *cis* CRT/DRE. Esta família de proteínas é conhecida por regulão CBF. Na sua estrutura, possuem o domínio conservado AP2 característico da família

de FTs AP2. O regulão CBF é composto pelos genes *CBF1/DREB1B*, *CBF2/DREB1C* e *CBF3/DREB1A*, que respondem a diversos tipos de stress abiótico, e pelos genes *DREB2A* e *DREB2B*, que respondem exclusivamente ao stress hídrico (Saibo *et al.*, 2009). Para regular a expressão de genes de tolerância a stress abiótico, os FTs *CBF1/DREB1B*, *CBF2/DREB1C* e *CBF3/DREB1A* não necessitam de alterações pós-traducional, enquanto que *DREB2A* e *DREB2B* necessitam de, pelos menos, um mecanismo de alteração pós-traducional, visto que a sua expressão é constitutiva em plantas (Nakashima e Yamaguchi-Shinozaki, 2006). O papel destes genes, como indutores da expressão de genes de tolerância à secura, foi provado através de ensaios realizados em *Arabidopsis* e em outras plantas, embora as plantas transgênicas apresentassem algumas características indesejáveis como o nanismo (Hsieh *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1998).

1.3.2.3.2 Aquaporinas (PiP2)

As aquaporinas são uma família de proteínas trans-membranares, com peso entre 23-31kDa, que se encontra presente em todos os organismos. Estas proteínas apresentam uma estrutura conservada, com seis domínios trans-membranares, que estão ligados entre si por três *loops* extras-celulares, e por dois intra-celulares, com as duas extremidades N- e C- terminal da proteína do lado citosólico (Tyerman *et al.*, 2002).

A estrutura das aquaporinas é tetramérica, composta por 4 monómeros, cada um com um poro activo (Maurel *et al.*, 2008).

Para além do transporte selectivo de água, as aquaporinas são também capazes de proceder ao transporte de outros não-electrólitos, como glicerol e ureia, assim como de gases (CO_2 e NH_4^+).

A função das aquaporinas, como reguladores do transporte de água, foi descoberta através da expressão de uma aquaporina humana em oócitos de *Xenopus*, em que se conseguiu aumentar a permeabilidade à água. Em plantas, a primeira aquaporina a ser descoberta foi a γ TIP, presente no tonoplasto, o que potenciou a pesquisa de mais genes desta família (Tyerman *et al.*, 2002).

As plantas possuem, no seu genoma, uma grande variedade de aquaporinas. Em *Arabidopsis thaliana* e em milho, foram identificados, respectivamente, 35 e 31

genes codificantes de aquaporinas, as quais, por homologia, foram agrupadas em quatro classes diferentes de aquaporinas. Os dois primeiros grupos, que são as menos presentes nas plantas, são as NIPs e as SIPs, com função ainda pouco conhecida. Os outros dois grupos, os mais abundantes em plantas, são as TIPs, presentes no tonoplasto, e as PIPs, presentes na membrana plasmática (Luu e Murel, 2005).

As PIPs dividem-se em duas subfamílias, as PIP1 e as PIP2. As PIP1 têm uma menor capacidade de transporte de água quando comparadas com as PIP2 (Chaumont *et al.*, 2000).

Este grupo de aquaporinas desempenha um papel de relevo nas plantas. São expressas de forma abundante na raiz, onde participam na absorção de água ao nível radicular. São também importantes nas folhas, onde participam no transporte de água do xilema para o mesófilo foliar (Luu e Murel, 2005).

As aquaporinas têm também um papel muito importante em situações de secura. Foram realizados vários estudos, incluindo em *Jatropha curcas*, que demonstram que, em casos de stress hídrico, a transcrição das PIPs é alterada, sendo que o padrão de expressão destes genes é coincidente com um aumento da tolerância das plantas (Martre *et al.*, 2002; Maurel *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2007).

A regulação transcricional destes genes é feita de diferentes formas. Podem ser induzidos por diferentes hormonas, como o ABA e as gibrelinas, por diferentes factores de stress abiótico (stress hídrico) (Maurel *et al.*, 2002) e por modificações pós-traducionais, através de fosforilação. A fosforilação da aquaporina leva à abertura do poro, em oposição ao mecanismo de fecho, que passa pela percepção de protões (Maurel *et al.*, 2008).

1.3.2.3.3 Fosfolipase D α (PLD α)

A fosfolipase D (PLD) é um enzima que está presente em todos os organismos conhecidos, e que possui o seu maior número de membros no reino vegetal. No genoma de *Arabidopsis*, por exemplo, estão presentes 12 membros desta família (Bargmann e Munnik, 2006).

A sua estrutura é caracterizada pela existência de um lado N- e C- terminal altamente conservados, sendo que o lado C- está reservado para processos catalíticos, e o lado N- para a ligação a regiões lipídicas. No lado C-, existem dois motivos

HxKxxxD, que são únicos para esta família de enzimas, e que promovem os processos catalíticos. Do lado N- terminal, podem estar presentes dois tipos de motivos, os PH e PX, e os C2. Os PH e PX estão ligados a mecanismos de transdução de sinal via PIP₂, enquanto que o C2 através de sinalização via Ca²⁺. Ambos estes motivos estão envolvidos na activação do enzima (Wang, 2000).

Entre as PLD, a mais comum em plantas é a PLD α . Trata-se de uma sub-família, dentro das PLD, com 3 membros, a PLD α 1, 2 e 3. Estes enzimas são regulados através de concentrações na ordem dos milimolar de Ca²⁺, e não requerem a presença de PIP₂, embora necessitem de um pH ácido (Bargmann e Munnik, 2006).

O processo de catálise das PLD, passa pela hidrólise de fosfolípidos estruturais da membrana plasmática, de forma a originar ácido fosfatídico (PA) e um grupo hidrofílico livre. O PA entra em diferentes processos celulares, metabólicos e de resposta a stress, o que ajuda a explicar a importância da PLD (Wang, 2000).

Diferentes estudos, realizados em plantas modelo, e inclusive em *Jatropha curcas*, demonstram o papel que esta família de enzimas tem na resposta ao stress hídrico (Hong *et al.*, 2008; Sang *et al.*, 2001; Bargmann *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). Em situações de stress hídrico, as PLD, e o seu composto de catálise, PA, actuam de formas diferentes para minimizar os efeitos do stress hídrico. A produção de ABA, induzida por uma situação de stress, leva à activação da PLD α 1, que produz PA. O PA, quando se encontra no meio celular, liga-se a uma fosfatase, PP2C (ABI), que regula negativamente a abertura dos estomas via ABA. A ligação de PA à PP2C vai promover um fecho estomático, contribuindo para uma redução da perda de água (Zhang *et al.*, 2004). A situação de stress hídrico origina também uma reacção entre a subunidade G α da proteína G, que se encontra na membrana plasmática, e a PLD α 1. Esta reacção leva a uma inibição da abertura estomática, o que complementa a acção de PA (Li *et al.*, 2009).

1.3.2.3.4 Trealose-6-fosfato sintetase (T6PS)

A trealose é, do ponto de vista bioquímico, um dissacárido composto por duas moléculas de glucose. Para além de ser um açúcar de reserva, é também conhecida por promover a tolerância das plantas em situações de stress hídrico (Wingler, 2002). Em situações deste tipo, a trealose liga-se por pontes de hidrogénio a outras moléculas

polares em vez da água. Através deste processo, previne a desnaturação de proteínas e a fusão de membranas. Para além disso, a trealose possui um processo de vitrificação, que estabiliza macro moléculas, assim como é muito estável em diferentes pHs e altas temperaturas (Wingler, 2002).

O seu processo de síntese, apesar de semelhante ao da sacarose, é possivelmente anterior, pois está presente em todos os organismos (Goddijn e van Dun, 1999). Para a sua síntese, há a intervenção de dois enzimas, trealose-6-fosfato sintetase (T6PS) e trealose-6-fosfato fosfatase (T6PP), de forma a sintetizar trealose a partir de duas moléculas de glucose (Goddijn e van Dun, 1999).

Em plantas, a síntese de trealose era conhecida em duas espécies de Angiospérmicas e em algumas espécies de fetos, e pensava-se inexistente na maioria das plantas superiores (Muller *et al.*, 1995). Com a identificação dos genes de T6PS, em *Arabidopsis* (Blázquez *et al.*, 1998), conseguiu-se provar que as plantas superiores também são capazes de sintetizar trealose. Em 2001, Leyman *et al.* identificaram 11 genes *T6PS-like* em *Arabidopsis*, assim como se identificou um efeito de regulação do metabolismo, por parte da T6PS, em diferentes partes do desenvolvimento das plantas (Avonce *et al.*, 2004). Foi também identificado o papel de trealose na estrutura e forma das células e da planta em si (Chary *et al.*, 2008; Veyres *et al.*, 2008).

Os níveis de trealose presentes nas plantas superiores nunca são muito elevados, uma vez que a principal fonte de armazenamento de açúcar é a sacarose. Para além disso, um excesso de trealose nas plantas impede alterações de conformação proteica, por acção de chaperoninas, em situações de stress (Leyman *et al.*, 2001).

Mesmo assim, num ensaio de sobre-expressão dos genes de *E. coli* que codificam a T6PS e TPP (*OtsA* e *OtsB*, respectivamente), em arroz, verificou-se que houve um aumento da tolerância à secura, assim como alterações morfológicas (Garg *et al.*, 2002). Noutro ensaio, em tomate, a expressão de *T6PS* utilizando como promotor CaMV 35S originou plantas com maior tolerância à secura, mas também com um desenvolvimento anormal (Cortina e Calíañez-Macià, 2005). Em feijoeiro, plantas transformadas com *Rhizobium etli*, onde tinha sido colocada uma construção para sobre-expressar o gene que codifica a T6PS, ocorreu igualmente um aumento da tolerância à secura por parte das plantas transformadas (Suárez *et al.*, 2008).

Nas plantas, um soluto é considerado compatível quando não apresenta sinais de toxicidade, quando em concentrações elevadas (Fernandez *et al.* 2010). Estes ensaios demonstraram os efeitos tóxicos da trealose, quando sintetizada em excesso nas plantas transformadas. Por outro lado, num ensaio em que se expressou o gene *T6PS* de *Saccharomyces cerevisiae* nos cloroplastos de *Arabidopsis* (Karim *et al.* 2007), houve um aumento de resistência por parte da planta, sem alterações morfológicas. Isto indica que a trealose pode potenciar a tolerância ao stress hídrico, quando concentrada em órgãos alvo, sem induzir anormalias no desenvolvimento das plantas.

1.3.2.3.5 Fosfatase 2C (ABI)

Em todos os organismos, a maioria dos processos biológicos são activados por vias de transdução de sinal. Nestas vias, um dos principais processos de regulação ocorre através de fosforilações reversíveis das proteínas, realizadas por proteínas cinases (fosforilação) e fosfatases (desfosforilação).

A família das fosfatases é muito diversa, e está dividida em duas classes. A primeira classe é composta pelas fosfatases de tirosina, e a segunda classe pelas fosfatases de serina/treonina. Dentro desta segunda classe, existem as fosfatases PPP e as PPM, diferenciadas pelas sequências de aminoácidos e pela sua estrutura (Cohen, 1997).

A PP2C é uma das fosfatases que está incluída na família PPM. Trata-se da maior família de fosfatases em plantas, visto que só no genoma de *Arabidopsis* foram até agora encontrados 76 genes codificantes desta família (Schweighofer *et al.*, 2004).

Para ocorrer a activação das PP2C, é necessária a presença dos co-factores Mg^{2+} ou Mn^{2+} . Embora seja conhecida a necessidade da presença de um destes iões para a sua activação, o mecanismo de regulação destas proteínas ainda não é totalmente conhecido. Supõem-se que as PP2C possam ser activadas e reguladas pelo nível de expressão da proteína, por proteólise (Schweighofer *et al.*, 2004), por mensageiros secundários (como demonstrado para uma PP2C de *Physcomitrella patens*, activada por calmodulina) (Takezawa, 2003), por lípidos derivados de outros enzimas (Zhang *et al.*, 2004), ou ainda por outros compostos produzidos pela planta, como o H_2O_2 (Meinhard *et al.*, 2002).

Em plantas, a proteína da família PP2C mais conhecida é a ABI1, tendo sido a primeira a ser caracterizada através da mutação *abi 1-1* (Meyer *et al.*, 1994). Estes mutantes demonstraram ser ABA-insensíveis, mantendo uma condutância estomática muito elevada (Assmann *et al.*, 2000). Em mutantes *ABI* recessivos, este gene demonstra uma hipersensibilidade para com o ABA (Gosti *et al.*, 1999), que se conseguiu aumentar em duplos mutantes *abi1/abi2* (Merlot *et al.*, 2001). Assim, devido a esta perda de função, identificou-se o ABI como regulador negativo de ABA.

A regulação de ABI passa por interferir na transdução de sinal, tendo já sido identificados mecanismos de feedback entre ABI1, o gene OST1, e ainda ROS produzidos pela planta (Nilson e Assmann, 2007). Para além disso, foi também detectado a regulação do factor de transcrição ATHB6, um regulador negativo dos genes induzidos por ABA, por meio de ABI1 (Himmelbach *et al.*, 2002).

2 Objectivos

Este projecto teve por objectivo estudar a expressão de genes de tolerância ao stress hídrico, em duas linhas de *Jatropha curcas* L., provenientes de dois ecótipos diferentes (tropical húmido - sudoeste asiático e árido – África). O estudo pretendeu ainda combinar dados morfológicos e fisiológicos, de forma a verificar se a expressão dos genes escolhidos para o trabalho (*ABF1*, *ABF2*, *T6PS*, *ABI*, *JcPiP2*, *JcPLD α* , e *JcERF*) têm alguma correspondência fenotípica e fisiológica nas plantas.

Para a avaliação da expressão génica, utilizaram-se genes que actuam a diferentes níveis na planta, em resposta a uma situação de stress hídrico. Os genes escolhidos encontram-se a regular a expressão génica (*ABF1*, *ABF2*, *JcERF*), com origem na via dependente do ABA e na via independente do ABA. Os restantes genes escolhidos (*ABI*, *JcPiP2*, *T6PS*, *JcPLD α*) são genes potencialmente regulados pelos anteriores, e directamente relacionados com o metabolismo ou transdução de sinal.

Os parâmetros fisiológicos escolhidos foram a condutância estomática, fotossíntese, a eficiência no uso de água, e a fluorescência clorofilina (eficiência do fotossistema II, Φ PSII).

Para este estudo foram programadas estratégias de biologia molecular, e de análise fisiológica, complementadas com parâmetros morfológicos, por forma a garantir uma análise integrada pioneira em *Jatropha curcas* L..

3 Materiais e métodos

3.1 Material vegetal e condições experimentais

Neste trabalho, foram utilizadas sementes de duas linhas, denominadas JAT08 e JAT238, sendo a primeira proveniente de um clima tropical húmido, e a segunda de um clima seco. As sementes, gentilmente fornecidas pela companhia *DIOils*, foram plantadas em vasos de 1L, com uma mistura de terra adubada, areia e turfa (1:1:1), crescidas em estufa (temperatura $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com 60% de humidade relativa, com fotoperíodo de 12h e com intensidade luminosa de $300 \text{ PAR } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) em estufa.

Plântulas com um mês de idade (fase em que possuem cerca de 2 a 3 folhas), foram colocadas durante o período experimental numa estufa em condições de temperatura, humidade relativa e fotoperíodo natural (período Julho-Agosto).

3.2 Ensaio de stress hídrico

O ensaio de stress hídrico foi realizado com dois grupos de plantas de ambos os ecótipos, um grupo controlo (com rega) e um grupo *secura* (supressão de rega). O ensaio foi dividido em dois tipos de medições: invasivas, que originaram danos nas plantas, e medições não invasivas. As medições invasivas realizadas foram RWC, quantidade de clorofila, densidade estomática, comprimento e morfologia das raízes. As medições não invasivas efectuadas foram a taxa de fotossíntese, condutância estomática, eficiência do fotossistema II, e a morfologia da folha e do caule. Foi ainda realizado um estudo de expressão génica, com genes seleccionados. Para cada tipo de medição, foram distribuídas plantas conforme descrito na Tabela 1. O stress hídrico foi mantido durante 16 dias após o qual seguiu-se um período de recuperação (rehidratação) de 8 dias. As plantas controlo foram regadas continuamente com 50mL de água, em dias alternados. Durante o período de stress hídrico, as plantas do grupo *secura* não foram regadas.

Ecótipo	Tratamento	Número de Plantas				
		IRGA/Exp. Génica	RWC	Clorofila	Morfologia	Raízes
Jat 08	Controlo	5	5	5	5	3
Jat 08	Secura	5	5	5	5	3
Jat 238	Controlo	5	5	5	5	3
Jat 238	Secura	5	5	5	5	3

Tabela 1. Número de plantas presente nas medições invasivas e não invasivas na experiência.

Legenda: IRGA – fotossíntese, condutância estomática, eficiência do fotossistema II; Exp. Génica – recolha de RNA para expressão génica (as medições de IRGA foram na mesma planta que a recolha de RNA)

3.3 Análise de expressão génica

3.3.1 Recolha das amostras

As amostras foram recolhidas aos dias 0, 8, 16 e 22 da experiência. As amostras de material fresco foram constituídas pelas folhas mais jovens colhidas de cada planta (<2cm de comprimento), de cada um dos dois ecótipos. Após colheita, as amostras foram congeladas em azoto líquido e conservadas a -80°C.

3.3.2 Extracção de RNA total de *Jatropha curcas* L.

Neste trabalho, foi necessário proceder à optimização de um protocolo eficiente para a extracção de RNA total desta espécie. O protocolo de extracção optimizado baseou-se no RNeasy extraction *kit*, Qiagen (EUA), com as alterações propostas em Gehrig *et al.* 2000. A 450µL de RLC Buffer, indicados no protocolo do Qiagen RNeasy extraction *kit*, adicionou-se 45µL PEG HWM-20000 2%. Com esta optimização foi possível obter cerca de 16µg de RNA total de elevada qualidade, a partir de 80mg de tecido foliar macerado. O RNA total foi extraído a partir das folhas recolhidas das plantas aos dias 0, 8, 16 e 22 (após re-hidratação) do ensaio de stress hídrico. O processo de extracção iniciou-se com a maceração das amostras em azoto líquido até à sua redução a um pó fino.

3.3.3 Quantificação do RNA total

A quantificação do RNA total foi feita por análise espectrofotométrica (NanoDrop 3300, Thermo Scientific, EUA) e também por análise electroforética em gel de agarose.

3.3.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi efectuada utilizando um *kit* comercial (cDNA Synthesis Kit for RT-PCR, Roche, Suíça) a partir de 1µg de RNA total. O cDNA foi posteriormente utilizado para a análise da expressão génica por RT-PCR.

3.3.5 Amplificação dos genes em estudo descritos na literatura

Estão descritos na literatura os genes *Jc18s* (utilizado como controlo), *JcERF*, *JcPLD* e *JcPiP* (Zhang *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010). Para realizar a amplificação dos genes em estudo, foram utilizados os oligonucleótidos específicos ERF Fw, ERF Rv, PLD Fw, PLD Rv, PiP Fw, PiP Rv, Jc18s Fw e Jc18s Rv (sequências específicas de cada primer na Tabela 2). A amplificação destas sequências foi realizada por RT-PCR num termociclador (Thermocycler T3000, Biometra, Alemanha), com as condições para *JcPiP2* de 28 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 57°C e 1 minuto a 72°C, para *JcPLD* de 27 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 52°C e 1 minuto a 72°C, para *Jc18s* de 23 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, e para *JcERF* de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 57°C e 1 minuto a 72°C. A mistura de reacção continha para todos os genes 0,04U de *Taq* DNA Polimerase (GoTaq® Flexi DNA Polimerase, Promega, EUA), com seu respectivo tampão (1x), 2mM de MgCl₂, 0,4 mM de desoxinucleotídeos (dNTP), e 0,4µM de Oligonucleótidos Fw e Rv, num volume total de reacção de 20µL. O resultado foi visualizado em gel de agarose a 0,9%, corado com brometo de etídeo, e comparado com marcador de peso molecular para confirmação específica de amplificação (Gene Ruler™, DNA Ladder Mix, 100-10000pb, Fermentas Life Science, EUA). As reacções de RT-PCR foram repetidas 2x para todos os genes em estudo, para comprovar os padrões de expressão.

Primers	Sequência 5' – 3'	Tipo Primer	Banda (pb)
ERF Fw	CCG ACT ACC CAA GAA CCG TA	Específico	590
ERF Rv	CAG CTT CGG CGA GTA TAA GC		
PLD Fw	ATT TTT CTG CAT TGG CAA CC	Específico	623
PLD Rv	GGA GGG AGG TAA TCA GAT TTG G		
PiP Fw	GTG ACC TTT GGG CTG TTT TTA G	Específico	450
PiP Rv	AAA TCC AAT GAT CAT CCC AGA C		
Jc18s Fw	AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG	Específico	320
Jc18s Rv	TCA TTA CTC CGA TCC CGA AG		
ABF Fw	AAG AAT ATI TGG AC(T/A) GC(T/A) GAG	Degenerado	975
ABF Rv	(T/A)(C/G)T TCC T(T/G)G TTT TTI ATC AT		
CBF Fw	GGI AAG TGG GTI TG(C/T) GAG GT	Degenerado	320
CBF Rv	TTC TTC (A/G)TC CAT (A/G)TA GAA IAC		
T6P Fw	CAT CA(A/G) TAT TAT AAT GGI TAT	Degenerado	663
T6P Rv	TTC IAG GAA TTT TTC GAA (A/T/G)GC		

Tabela 2. Sequências de primers específicos e degenerados utilizados na experiência. Os tamanhos esperados das bandas amplificadas pelos primers degenerados, e os tamanhos das bandas com base nas sequências de *J. curcas*, estão indicados em pares de base (pb).

3.3.6 Isolamento de genes de *Jatropha curcas* L. relacionados com stress

3.3.6.1 Desenho de oligonucleótidos degenerados

Para proceder ao isolamento das sequências dos genes *T6PS*, *ABF* e *CBF* de *Jatropha curcas*, foram utilizados os oligonucleótidos degenerados ABF Fw, ABF Rv, CBF Fw, CBF Rv, T6P Fw e T6P Rv (sequências dos primers degenerados na Tabela 2). ABF e T6P tiveram origem nas sequências de *Ricinus communis* e *Populus trichocarpa*, com os números de acesso na Genebank, para ABF, XP_002518757.1 e XP_002330296.1, respectivamente, e para T6P os números de acesso EEF31134.1 e EEF11014.1, respectivamente. Para CBF a sua origem foi nas sequências de *Ricinus communis* e de *Hevea brasiliensis*, que têm o número de acesso na Genebank XP_002518757.1 e AAY43213.1, respectivamente.

A amplificação destas sequências foi realizada por PCR num termociclador (Thermocycler T3000, Biometra, Alemanha), com as condições para ABF e para CBF de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 56°C e 1 minuto a 72°C, para T6P de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 52°C e 1 minuto a 72°C. A mistura de reacção continha para todos os genes 0,04U de *Taq* DNA Polimerase (GoTaq® Flexi DNA Polimerase, Promega, EUA), com seu respectivo tampão (1x), 2mM de MgCl₂, 0,4 mM de desoxinucleotídeos (dNTP), e 0,4µM de Oligonucleótidos Fw e Rv, num volume total de reacção de 20µL. O resultado foi visualizado em gel de agarose a 0,9%, corado com brometo de etídeo, e comparado com marcador de peso molecular para confirmação específica de amplificação (Gene Ruler™, DNA Ladder Mix, 100-10000pb, Fermentas Life Science, EUA).

As bandas obtidas foram isoladas com recurso ao *kit* de purificação de bandas de agarose (High Pure PCR Purification Kit, Roche, Suíça).

3.3.6.2 Clonagem dos genes em estudo

Os fragmentos de cDNA dos genes foram clonados em bactérias competentes da estirpe de *Escherichia coli* DH5α. A clonagem foi realizada por TA-cloning, utilizando o plasmídeo pCR2.1 (TA Cloning® Kit, Invitrogen, EUA). As bactérias foram transformadas através de um protocolo de choque térmico. As colónias bacterianas foram cultivadas em meio LB (Luria Broth) sólido (extracto de levedura [5g/L], triptona [10g/L], NaCl [10g/L] e agar agar [15g/L], com pH 7,2), com agente de selecção Carbenicilina (100µg/mL), e colocadas a crescer a 37°C. Foi adicionado ao meio 40µL de X-Gal (40µg/mL, bromo-chloro-indolil-galactopiranosidase), de forma a seleccionar as colónias de bactérias transformadas. As colónias brancas (putativamente transformadas) foram seleccionadas, e a inserção do fragmento foi verificada através de colony-PCR. As colónias de bactérias que amplificaram o fragmento de interesse foram crescidas em meio LB líquido suplementado com 100µg/L de Carbenicilina, e o plasmídeo extraído com recurso ao *kit* de extracção (Plasmid DNA MiniPreps Kit, EasySpin, Citomed, Portugal). O plasmídeo purificado foi posteriormente enviado para sequenciar.

3.3.6.3 Isolamento da região 3' dos genes em estudo por 3' RACE

3' RACE é uma técnica utilizada, em biologia molecular, para isolar a região 3' de um gene. É utilizado um primer Oligo(dT)_n específico, durante a síntese de cDNA, que contem dois nucleótidos específicos antes da região poli-T, e uma região MCS de sequência conhecida após a região poli-T (Borson *et al.*, 1992). Assim, utilizando um primer Fw, específico para uma sequência génica conhecida, e com o primer Rv específico para a região MCS, posterior à cauda poli-T, é possível amplificar a região 3' de um gene que não seja conhecido na sua totalidade.

O protocolo inicia-se com a síntese de cDNA, utilizando o oligo(dT)_n específico. O resto do protocolo de síntese é igual ao de um *kit* comercial (cDNA Synthesis Kit for RT-PCR, Roche, Suíça).

Com as sequências das regiões internas dos genes em estudo sequenciadas, foram utilizados os oligonucleótidos específicos, para a região 3', ABF1 Fw 5' GGA TCT CCT GCA AAC CAC AT 3' e ABF1 Fw2 5' GGT AAC GCA GAT ACG CCT TC 3', ABF2 Fw 5' GAG CAA CGG TGA TAC TTC TTC A 3' e ABF2 Fw2 5' TGG AGA AGG TGG TTG AAA GG 3' T6PS Fw 5' TCA AGT CCA GGA TCA TAT CAA AGA 3' e T6PS Fw2 5' TTA GGT GTT GAT CGC CTT GA 3', e ABI Fw 5' GCA ATG TCA AGA TCC ATT GGT 3' e ABI Fw2 5' CAT GTG ATC TTG CTC GGA GA 3'. Estes primers foram desenhados com recurso ao programa Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000, <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Como primer Rv, foi utilizado o Primer específico ADP, de sequência 5' CCG CAG ATC TAG ATA TCG A 3', presente no Oligo(dT)_n, específico para a síntese de cDNA de 3' RACE.

A amplificação destas sequências foi realizada por PCR num termociclador (Thermocycler T3000, Biometra, Alemanha), com um passo de purificação intermédio. Este passo de purificação foi realizado para purificar o produto de PCR, de forma a eliminar todos os elementos que pudessem interferir com a segunda amplificação por PCR. Primeiro, a amplificação foi realizada por PCR com as condições para ABF de 15 ciclos de 1 minuto segundos a 95°C, 45 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, para T6P de 15 ciclos de 1 minuto a 95°C, 45 segundos a 55°C e 2 minutos a 72°C, e para ABI de 15 ciclos de 1 minuto a 95°C, 45 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C. Cada reacção continha 0,05U de *Taq* DNA Polimerase (GoTaq® Flexi DNA Polimerase, Promega, EUA), com seu respectivo tampão (1x), 2mM de MgCl₂,

0,4 mM de desoxinucleotídeos (dNTP), e 0,5 μ M de Primer Fw, num volume total de reacção de 20 μ L. Neste passo, o produto de PCR obtido na primeira amplificação foi purificado com recurso ao *kit* de purificação de produtos em solução (High Pure PCR Purification Kit, Roche, Suíça).

Após a purificação, foi realizada nova amplificação por PCR, no mesmo termociclador que anteriormente, com as condições para ABF de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, para T6P de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 45 segundos a 55°C e 2 minutos a 72°C, e para ABI de 32 ciclos de 1 minuto a 95°C, 45 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C. Cada reacção continha 0,05U de *Taq* DNA Polimerase (GoTaq® Flexi DNA Polimerase, Promega, EUA), com seu respectivo tampão (1x), 2mM de MgCl₂, 0,4 mM de desoxinucleotídeos (dNTP), e 0,5 μ M de Primer Fw 2 e 0,3 μ M de Primer Rv, para todos os genes, num volume total de reacção de 20 μ L. O resultado foi visualizado em gel de agarose a 0,9%, corado com brometo de etídeo, e comparado com marcador de peso molecular de 100 pb para confirmação específica de amplificação (Gene Ruler™, DNA Ladder Mix, 100-10000pb, Fermentas Life Science, EUA).

As bandas obtidas foram isoladas com recurso ao *kit* de purificação de bandas de agarose (High Pure PCR Purification Kit, Roche, Suíça). Seguidamente foram clonadas e enviadas para sequenciar, pelo método descrito anteriormente (ponto 3.3.6.2).

3.3.6.4 Isolamento da região 5' dos genes em estudo por 5' RACE

A técnica de 5' RACE é utilizada para isolar a região 5' de um gene. Utiliza-se um enzima específico, TdT (Deoxinucleotidil terminal transferase), que adiciona nucleótidos na região 3' de cadeias de cDNA, e um par de primers Rv específicos para a região 5' da sequência conhecida. Após a síntese de cDNA, são adicionados dCTPs, que vão criar uma cauda poli-C. Após a síntese de cDNA, a amplificação da região 5' do gene é feita através de um primer Fw específico Oligo(dG)_n, que emparelha com a cauda poli-C, e um dos primers Rv específicos.

Com as sequências das regiões internas dos genes em estudo sequenciadas, foram utilizados os oligonucleótidos específicos, para a região 5', ABF1 Rv 5' GCT GGA ACG CAA GAG CTA AA 3' e ABF1 Rv2 5' GGC CAA GAA CTC CTC CAA

AG 3', ABF2 Rv 5' CCC AGC TCT CAC CAA AAA CT 3' e ABF2 Rv2 5' TGG GGC ACA TTA GCT ACT CC 3', T6P Rv 5' GCT CAT TCA CCA CAT CAG CA 3' e T6P Rv2 5' AGG CGA TCT TCT TGT GGA AG 3', T6P, e ABI Rv 5' TCC ACT GCT CTA CGC AAC TG 3' e ABI Rv2 5' GCC GTT TGG TGA GTT ATA TAC TTG 3'. Estes primers foram desenhados com recurso ao programa Primer3. Como primer Fw, foi utilizado o Primer Oligo(dG)_n, específico para a amplificação de cDNA em 5' RACE.

Foi seguido um protocolo de 5' RACE existente no laboratório, assente em 4 passos. O protocolo começa com a síntese de cDNA, utilizando o primer Rv específico, para a região 5' dos genes em estudo. O resto do protocolo de síntese é igual ao de um *kit* comercial (cDNA Synthesis Kit for RT-PCR, Roche, Suíça).

O segundo passo envolve a degradação do RNA, elaborado numa reacção que contém 1x Reaction Buffer de RNaseH e 0.125U de RNaseH, num volume total de reacção de 20µL. Este passo é feito com uma incubação de 20 minutos a 37°C, seguido de um período de inactivação do enzima por 15 minutos a 65°C.

No terceiro passo, purifica-se o produto de incubação com recurso ao *kit* de purificação de produtos em solução (High Pure PCR Purification Kit, Roche, Suíça).

O quarto passo promove a síntese da cauda de poli-C. Cada reacção de síntese contém 1x TdT Buffer, 1,5mM de CoCl₂, 0,4mM de deoxicitosina trifosfato (dCTP), num volume de reacção de 20µL. É realizada uma incubação a 72°C, por 10 minutos, seguida de uma segunda incubação a 37°C, por 2 minutos. Adiciona-se TdT, para formar a cauda poli-C na extremidade 3' da cadeia de cDNA recém formada. Incuba-se novamente a 37°C por 10 minutos. A última incubação é realizada a 65°C por 15 minutos, para desnaturar o enzima.

O último passo envolve a amplificação do cDNA. A amplificação destas sequências foi realizada por PCR num termociclador (Thermocycler T3000, Biometra, Alemanha). Primeiro, a amplificação foi realizada por PCR com as condições para *ABF 1* e *2*, *T6PS* e *ABI* de 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 45 segundos a 50°C e 50 segundos a 72°C. Cada reacção continha 0,04U de *Taq* DNA Polimerase (GoTaq® Flexi DNA Polimerase, Promega, EUA), com seu respectivo tampão (1x), 2mM de MgCl₂, 0,4 mM de desoxinucleotídeos (dNTP), 0,4µM de Primer FwOligo(dG)_n, 0,3µM de Primer Rv2, e DMSO 4% (v/v), para um volume total de reacção de 20µL. Neste passo, a adição do Primer Rv2 é efectuada no final do 16º ciclo.

O resultado foi visualizado em gel de agarose a 0,9%, corado com brometo de etídeo, e comparado com marcador de peso molecular para confirmação específica de amplificação (Gene Ruler™, DNA Ladder Mix, 100-10000pb, Fermentas Life Science, EUA).

As bandas obtidas foram isoladas com recurso ao *kit* de purificação de bandas de agarose (High Pure PCR Purification Kit, Roche, Suíça). Seguidamente foram clonadas e enviadas para sequenciar, pelo método descrito anteriormente (ponto 3.3.6.2).

3.3.6.5 Amplificação dos genes em estudo isolados

Os genes isolados, com recurso às técnicas descritas anteriormente (*ABI*, *ABF1*, *ABF2* e *T6PS*), foram amplificados utilizando os oligonucleótidos específicos T6PS Fw 5' CTG GCC ACA ACC AGA AGT TT 3', T6PS Rv 5' TGA TAT GAT CCT GGA CTT GAG G 3', ABF1 Fw, ABF1 Rv, ABF2 Fw, ABF2 Rv, ABIT2 Fw 5' ACC GGG TCT TTG ATG GTA TG 3', ABIT2 Rv 5' TCC ACA GAC AAT GCC ATA GG 3'. A amplificação destas sequências foi realizada por RT-PCR num termociclador (Thermocycler T3000, Biometra, Alemanha), com as condições para *T6PS* de 31 ciclos de 30 segundos a 95°C, 50 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C, para *ABF1* e *ABF2* de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C., e para *ABI* de 28 ciclos de 30 segundos a 95°C, 50 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C. A mistura de reacção continha para todos os genes 0,04U de *Taq* DNA Polimerase (GoTaq® Flexi DNA Polimerase, Promega, EUA), com seu respectivo tampão (1x), 2mM de MgCl₂, 0,4 mM de desoxinucleotídeos (dNTP), e 0,4µM de Oligonucleótidos Fw e Rv, num volume total de reacção de 20µL. O resultado foi visualizado em gel de agarose a 0,9%, corado com brometo de etídeo, e comparado com marcador de peso molecular de 100 pb para confirmação específica de amplificação (Gene Ruler™, DNA Ladder Mix, 100-10000pb, Fermentas Life Science, EUA). As reacções de RT-PCR foram repetidas 2x para todos os genes em estudo, para comprovar os padrões de expressão.

3.4 Análise fisiológica

3.4.1 Recolha das amostras

As amostras foram recolhidas em dias diferentes, consoante as análises fisiológicas. As amostras para RWC, para a quantificação de clorofila, para a densidade estomática e para a análise morfológica foram recolhidas aos dias 0, 8, 16 e 22 da experiência. A recolha de raízes foi realizada aos dias 0, 16 e 22 da experiência. As medições estomáticas foram realizadas aos dias 0, 16, 20 e 22 da experiência. Esta recolha de amostras teve um dia suplementar (dia 20), para evidenciar a resposta estomática ao longo do período de recuperação.

3.4.2 Medições estomáticas

A análise da fotossíntese e das trocas gasosas foram efectuadas com um aparelho IRGA (Infra-Red Gas Analyzer), modelo Li-6400 (Li-Cor), pelas 10h da manhã, no mesmo dia e na mesma planta em que eram recolhidas as amostras de folhas para a análise da expressão génica. As medições foram efectuadas na terceira folha mais jovem, totalmente expandida, de todas as plantas controlo e em situação de secura. Devido a algumas situações de necrose foliar, a partir de dia 16 as medições foram efectuadas na segunda folha mais jovem, totalmente expandida. As variáveis analisadas foram a taxa de fotossíntese (A), a condutância estomática (g_s), e ainda a eficiência do fotossistema II (Φ_{PSII}). Com base nos dados obtidos nas medições do IRGA, foi também calculada a eficiência no uso de água (WUE). O WUE calcula-se com base na fórmula $WUE = A/E$, onde A é a taxa de fotossíntese, e E a taxa de transpiração. O valor de E foi analisado e registado pelo IRGA no mesmo dia em que os outros valores foram registados.

As condições da câmara de medição do IRGA foram constantes durante o ensaio com temperatura do bloco de medição do IRGA a 28°C, concentração de CO_2 de 400 ppm, intensidade luminosa de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e com fluxo de $500 \mu\text{mol s}^{-1}$.

3.4.3 Teor foliar relativo de água (RWC)

O teor foliar relativo de água (RWC) é uma técnica que permite quantificar a quantidade de água presente na folha. A técnica de RWC foi feita de acordo com o processo descrito por Weatherly (1950). Foram utilizados pequenos discos de folhas, com cerca de 3cm de diâmetro, retirados da terceira folha mais jovem, de todas as plantas controlo e em situação de secura. Os discos foram imediatamente pesados para obter o seu peso fresco. De seguida, os discos foliares foram colocados à superfície de água por 4h, com a face abaxial em contacto com a água. O seu peso túrgido foi registado após este período e os discos foram de seguida colocados a secar a 50°C até atingirem um peso seco constante. O RWC calcula-se com base na fórmula:

$$\% \text{ RWC} = \frac{\text{Peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{Peso túrgido} - \text{peso seco}} \times 100$$

3.4.4 Quantificação do teor de clorofila

Na quantificação do teor de clorofila, foi utilizado o método descrito por Lichtenthaler (1987), em que a extracção das clorofilas é feita com recurso a acetona (80%). A quantificação de clorofila foi realizada na terceira folha mais jovem, com recurso a discos foliares, 3 por planta, com 1,9 cm de diâmetro. O seu teor foi determinado por espectrofotometria (Du 70 Spectrophotometer, Beckman, EUA), através da leitura de absorvância a 663 nm para a clorofila *a*, e a 645 nm para a clorofila *b*. Os teores de clorofilas (g kg^{-1}) foram calculados pelas seguintes fórmulas:

$$\text{Chla} = [(12,25 * \text{abs } 663) - (2,79 * \text{abs } 645)] * [V / (1000 * MF)]$$

$$\text{Chlb} = [(21,5 * \text{abs } 645) - (5,1 * \text{abs } 663)] * [V / (1000 * MF)]$$

Chla e Chlb são, respectivamente, os teores de clorofila *a* e *b*, e abs 663, abs 645, as absorvâncias a 663 e a 645 nm, respectivamente. *V* corresponde ao volume da diluição usada (mL) e *MF* a massa fresca (g).

3.4.5 Densidade estomática

A densidade estomática consiste na contagem de estomas, na face abaxial da folha, num determinado campo visual. A recolha das amostras foi realizada na terceira folha mais jovem, com remoção da epiderme do lado abaxial da folha. A remoção da epiderme foi efectuada com recurso a verniz. A aplicação do verniz teve como efeito a criação de uma cópia da superfície abaxial da folha, visto a remoção da mesma ser difícil. A densidade estomática foi quantificada através da contagem de estomas por microscopia, com ampliação de 200x, e com recurso à fórmula:

$$\text{Densidade estomática} = \frac{\text{Número de estomas}}{\text{Número de células totais}} \times 100$$

3.4.6 Tamanho das raízes e peso seco

As recolhas para avaliar o tamanho das raízes e do peso seco foram feitas nos dias 0, 16 e 22 da experiência. O tamanho das raízes foi avaliado através da medição do comprimento da raiz mais longa, assim como também se procedeu à avaliação da morfologia da raiz. As raízes foram lavadas, para remoção do excesso de terra, e foram posteriormente medidas com auxílio de uma fita métrica e de um crivo. Após as medições efectuadas, as plantas foram colocadas numa estufa a 50°C, até atingirem o seu peso seco.

3.4.7 Análise morfológica das plantas

Como parâmetros morfológicos, foram medidos o diâmetro e comprimento do caule, a largura e comprimento da folha, e ainda o número de folhas novas. A recolha destes dados foi feita nos dias 0, 8, 16 e 22 da experiência, e as medições foram efectuadas com a ajuda de uma fita métrica e de um crivo.

3.5 Análise estatística

Foi feita uma análise pelo teste de *t*-Student ($p < 0,05$) a todos os dados

recolhidos durante a experiência, analisados através de software de análise estatística.

4 Resultados

Os resultados apresentados de seguida estão divididos em três partes, sendo que cada parte corresponde a uma fase do trabalho elaborado neste projecto. A primeira parte dos resultados corresponde à identificação e ao isolamento dos genes candidatos, em *Jatropha curcas* L.. São apresentados os resultados das correspondências obtidas entre as sequências depositadas na base de dados e as sequências isoladas, pelos primers degenerados e por 3' RACE. A segunda parte dos resultados é referente aos ensaios de expressão génica, realizados nas linhas JAT 08 e JAT 238. Os resultados foram obtidos por amplificação dos genes descritos na literatura, e dos genes que foram isolados na primeira parte dos resultados. A terceira parte dos resultados obtidos neste trabalho apresenta os valores de medições morfo-fisiológicas, efectuadas nos dois ecótipos de *J. curcas*. As medições foram realizadas por processos invasivos e não invasivos.

4.1 Identificação e isolamento das sequências dos genes putativos *ABI*, *ABF1,2* e de *T6PS*

Com o objectivo de isolar as sequências dos genes *ABF*, *CBFs*, e *T6PS*, foram utilizados os primers degenerados desenhados com base nas sequências de *Ricinus communis* e *Populus trichocarpa*. Para o desenho destas sequências, não foram utilizadas regiões de famílias altamente conservadas, de forma a minimizar o número de genes onde os primers poderiam emparelhar de forma inespecífica. De todos os fragmentos amplificados pelos primers degenerados, não foram utilizados aqueles que apresentavam um tamanho fora do esperado em *P. trichocarpa* e em *R. communis* (demasiado grandes ou demasiado pequenos, exemplo Figura 2). Todos os fragmentos que se enquadravam neste critério foram clonados no vector pCR 2.1, e posteriormente enviados para sequenciar. As sequências obtidas por sequenciação foram comparadas com sequências depositadas na base de dados (GeneBank, NCBI), através do algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990, NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Os alinhamentos efectuados entre as sequências obtidas pelos primers degenerados, e as sequências correspondentes no GeneBank, estão colocados nos Anexos.

Nome	Tam. banda em gel	Tam. real sequência	BLAST	Identidade	Proteína prev.
CBF b 1-1	900pb	891pb	XM_002516054/R. <i>communis</i>	86%	Fosfatase PP2C/ABI
T6PS b 1-1	650pb	648pb	XM_002531191/R. <i>communis</i>	90%	T-6-fosfato sintetase
ABF b 1-1	1000pb	810pb	XM_002518711.1/R. <i>communis</i>	79%	DNA binding prot
ABF b 2-2	800pb	750pb	DQ487100.1/P. <i>trichocarpa</i>	77%	ABF2 binding prot

Tabela 3. Dados das sequências obtidas pelos primers degenerados. Nesta tabela estão apresentados os nomes, tamanho da banda isolada no gel, tamanho real da sequência utilizada para desenho de primers específicos, espécie e número de acesso obtido por BLAST no NCBI (BLAST), identidade, e proteína prevista das sequências que obtiveram correspondência com a base de dados NCBI. Os nomes apresentados foram escolhidos em função dos primers degenerados. Os tamanhos aproximados são relativos ao que foi amplificado no gel de agarose pelos primers degenerados. Todos os outros segmentos amplificados não apresentaram correspondência com o GeneBank (NCBI).

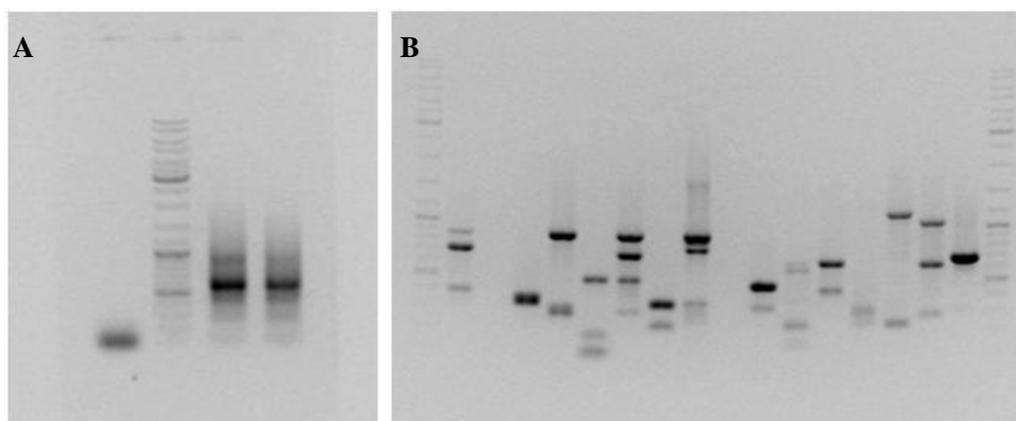


Figura 2. Amplificação das sequências alvo dos genes candidatos, a partir dos primers degenerados. Amplificação das sequências dos genes realizada com cDNA de JAT 08 e de JAT 238. A), amplificação de *T6PS*, bandas com tamanho aprox. 650pb; B), amplificação de *CBFs*, apenas as bandas de tamanho aprox. 900pb foram consideradas. Marcador de peso molecular para confirmação específica de amplificação de modelo Gene Ruler™, DNA Ladder Mix, 100-10000pb, Fermentas Life Science, EUA.

Verificou-se que apenas 4 fragmentos, entre todos os que foram amplificados e enviados para sequenciar, apresentavam correspondência (Tabela 3). Não se conseguiu amplificar nenhum fragmento referente à família *CBF*. Ao invés disso, foi obtido um *hit* com a sequência do gene *ABI* (*PP2C*, fosfatase 2C), que apresenta

elevada homologia. Foi possível, a partir do primer degenerado para *ABF*, isolar dois genes, *ABF 1* e *ABF 2*, com taxas de homologia razoáveis, mas que não nos permitem assegurar que se tratam dos genes pretendidos. Os fragmentos obtidos passaram a ser designados, no resto do presente trabalho, pelo nome do gene que foi obtido no seu *hit* com o GeneBank.

4.2 Isolamento das sequências 3'RACE e 5'RACE dos genes *ABI*, *ABF1,2* e de *T6PS*

Com parte da sequência dos genes conhecida, foi de seguida realizado o isolamento das sequências da região 3' dos genes em estudo. Foram utilizados, para cada um dos genes, primers específicos para a região mais a montante das sequências conhecidas, de forma a amplificar a região 3'.

Nome	Tam. Banda em gel	Tam. real sequência	BLAST	Identidade	Proteína prevista
ABI	650pb	670pb	XM_00251605 4/R. <i>communis</i>	86%	Fosfatase PP2C/ABI
T6PS	2800pb	648pb	XM_00253119 1/R. <i>communis</i>	90%	T-6-fosfato sintetase
ABF 1	600pb	543pb	XM_00251871 1.1/R. <i>communis</i>	82%	DNA binding protein
ABF 2	600pb	440pb	XM_00251016 3.1/ R. <i>communis</i>	85%	DAN binding protein

Tabela 4. Dados das sequências obtidas pelos primers específicos para amplificar região 3'. Nesta tabela estão apresentados os nomes, tamanhos da banda em gel, tamanho real da sequência desde o primer Fw até a região UTR, espécie e número de acessão obtido por BLAST no NCBI (BLAST), identidade, e proteína prevista das sequências que obtiveram correspondência com a base de dados NCBI. Os nomes originais escolhidos em função dos primers degenerados. Os tamanhos aproximados são relativos ao que foi amplificado no gel de agarose pelos primers degenerados. Todos os outros segmentos amplificados não apresentaram correspondência com o GeneBank (NCBI).

De todos os fragmentos amplificados pelos primers específicos, desenhados para 3'RACE, apenas foram considerados aqueles que apresentavam um tamanho semelhante ao esperado para *P. trichocarpa* e para *R. communis* (Figura 3).

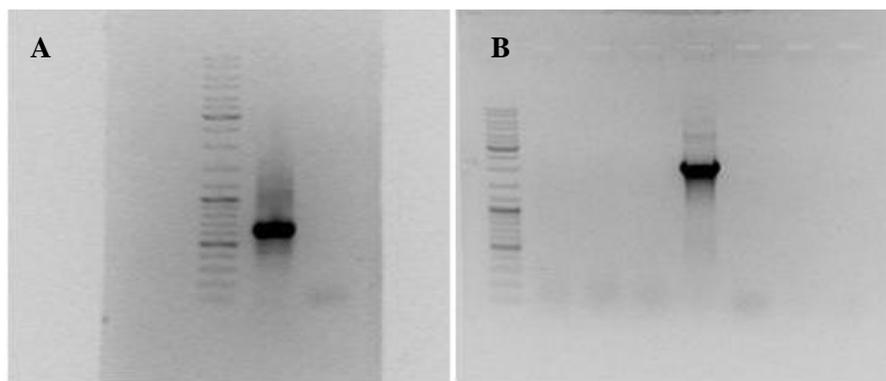


Figura 3. Amplificação da região 3' dos genes isolados, a partir dos primers específicos. Amplificação das sequências dos genes realizada com cDNA de JAT 08. A), amplificação de *ABI*, banda com tamanho aprox. 600pb; B), amplificação de *T6PS*, com banda de tamanho aprox. 2800pb. As imagens são de amplificações realizadas por colony-PCR. Marcador de peso molecular para confirmação específica de amplificação de modelo Gene Ruler™, DNA Ladder Mix, 100-10000pb, Fermentas Life Science, EUA

Todos os fragmentos que se enquadravam neste critério foram clonados no vector pCR 2.1, e posteriormente enviados para sequenciar. As sequências obtidas por sequenciação foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados (GeneBank, NCBI). Os resultados dos *hits* obtidos estão apresentados na Tabela 4. As sequências da região 3' dos genes obtidos contêm a região codificante e a região não codificante.

A técnica de 5' RACE foi tentada várias vezes, sem se conseguir amplificar fragmentos de nenhum dos genes em estudo. Foram igualmente tentadas algumas alterações de forma a obter amplificação, o que não foi possível durante a execução deste trabalho.

4.3 Estudo de expressão génica

Jatropha curcas L. é ainda considerada uma planta selvagem, na qual apenas recentemente se começou a investir no melhoramento. Por não dispormos de linhas clonais, o estudo de expressão génica foi realizado com germinantes obtidos de sementes de polinização aberta de cada uma das linhas de plantas. Foram usadas plantas controlo para cada linha, de forma a reduzir o efeito do genótipo em eventuais alterações de expressão génica. A amplificação dos genes foi realizada por RT-PCR (PCR de transcriptase inversa), e permitiu analisar o seu padrão de expressão ao longo

do tempo, nas plantas dos dois ecótipos, em situação controlo e em secura. A amplificação dos genes foi repetida duas vezes, de forma a garantir a existência de réplica técnica.

Para o estudo de expressão génica, foram utilizados genes de *Jatropha curcas* L. já descritos na literatura como envolvidos na resposta ao stress hídrico, assim como os genes isolados durante este trabalho. O material utilizado, para esta amplificação, foi representativo das 5 plantas de onde foi recolhido o RNA total para se proceder ao RT-PCR. Os resultados estão apresentados na Figura 4.

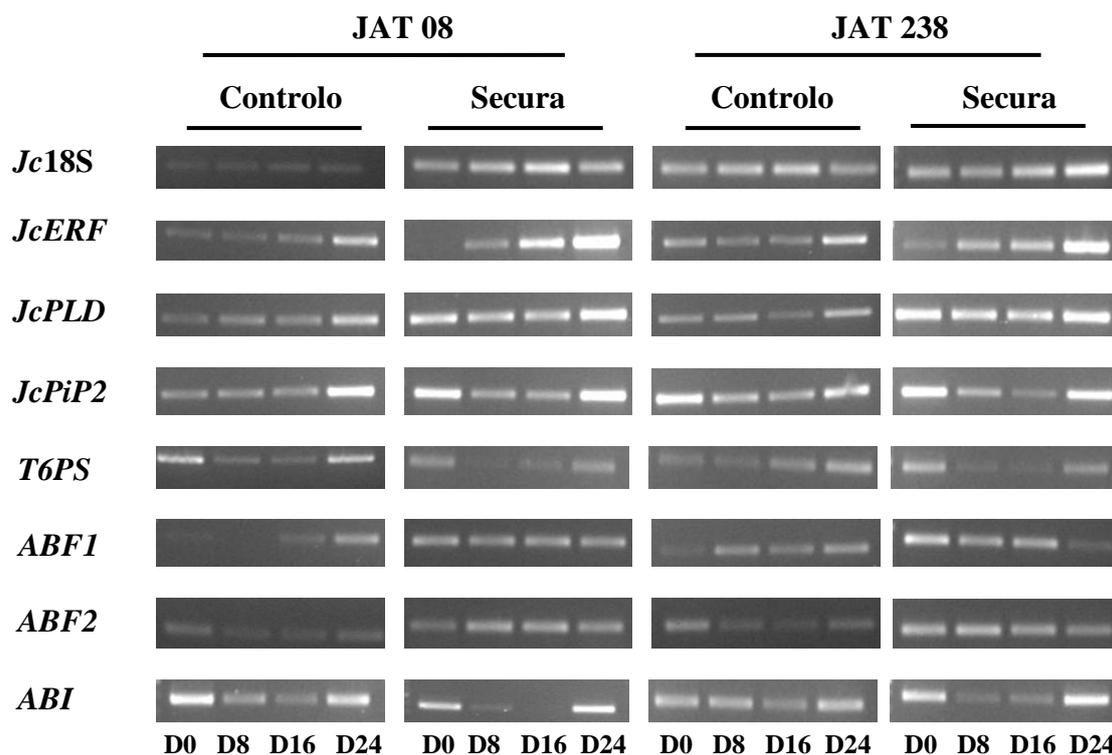


Figura 4. Análise da expressão génica por RT-PCR entre plantas das linhas JAT 08 e JAT 238, em condições de controlo e de secura. Diferenças de expressão entre as duas linhas, em situação controlo e de stress hídrico, ao longo do tempo. Os níveis de expressão foram registados, para os diferentes genes, no dia 0, dias 8 e 16 de secura, e no dia 22 (após uma semana de re-hidratação). A amplificação foi feita para os genes específicos, desenhados a partir das sequências isoladas. Os genes *T6PS*, *ABF 1* e *2*, e *ABI* necessitam ainda de confirmação (genes putativos). *Jc18S* foi utilizado como gene controlo (Liu *et al.*, 2010).

A análise da expressão génica foi efectuada a partir de RNA total isolado de folhas jovens (<2cm) de plantas das duas linhas, submetidas aos dois tipos de tratamento. Com base nas amplificações obtidas, podemos verificar que o gene

JcERF, em situação de secura, parece possuir um padrão de expressão igual nos dois ecótipos, com tendência para um aumento de expressão ao longo do tempo.

O gene *JcPLD* apresenta, nos dois tratamentos, um padrão de expressão muito semelhante nos dois ecótipos. Em situação controlo e sob stress hídrico, este gene mostra uma expressão constante ao longo do tempo nas duas linhas.

Sob stress hídrico, a expressão de *JcPiP2* apresenta um padrão igual nas duas linhas. É visível uma redução ao nível da expressão deste gene, durante o tempo em que decorre a indução de secura. Em situação controlo, o ecótipo JAT 238 apresenta um comportamento semelhante ao registado em secura, embora os níveis de expressão sejam ligeiramente superiores.

Os padrões de expressão dos genes isolados neste trabalho foram igualmente registados. O gene putativo *T6PS* revela, sob stress hídrico, uma redução na expressão entre o dia 8 e o dia 16, para as duas linhas. No entanto, a linha JAT 08, em situação de controlo, mostra um comportamento semelhante à secura, com um padrão de expressão igual entre os dias 8 e 16. Este facto, em conjunto com níveis de intensidade das bandas um pouco superiores ao registados em secura, dificulta a interpretação dos resultados.

Os genes putativos *ABF1* e *ABF2*, nos dois ecótipos em estudo, tem padrões de expressão em situação controlo, e em situação de secura, que não aparentam qualquer tipo de variação significativo.

O gene putativo *ABI* apresenta na linha JAT 08, em situação controlo, um decréscimo de expressão nos mesmos dias que do ensaio de secura. No mesmo tipo de tratamento, JAT 238 mostra um nível de expressão constante ao longo do tempo. Em secura, a expressão deste gene sofre uma redução quando comparada com a obtida em controlo, nas duas linhas. Este efeito é particularmente visível no dia 16 (secura máxima).

4.4 Estudo de aspectos morfo-fisiológicos de *Jatropha curcas* L.

Neste trabalho procurámos identificar quais as alterações que ocorrem nas duas linhas em estudo de *J. curcas*, durante a resposta ao stress hídrico. Foram avaliados parâmetros fisiológicos e morfológicos nas duas linhas, através de processos invasivos e não invasivos. Foi utilizado um aparelho IRGA para registar os dados fisiológicos de forma não invasiva (taxa de fotossíntese, condutância estomática, eficiência do fotossistema II e WUE) ao longo do tempo da experiência. Os dados morfológicos não invasivos foram registados através de aparelhos de medição de uso corrente, no mesmo espaço temporal. Os dois tipos de dados revelam a existência de algumas diferenças entre os ecótipos JAT 08 e JAT 238 de *Jatropha curcas* L..

4.4.1 Dados obtidos por IRGA

No dia 0 da experiência, a taxa de fotossíntese (A) apresentada pelas linhas JAT 08 e JAT 238 revela um valor muito semelhante, embora JAT 08 tenha um valor base ligeiramente superior que JAT 238. As plantas dos dois ecótipos, ao fim de 8 dias em situação de secura, apresentam uma redução drástica da taxa de fotossíntese. Este comportamento é mantido durante a segunda semana de secura, como foi registado dia 16. Durante o período de re-hidratação, JAT 08 mostra uma recuperação da taxa de fotossíntese mais rápida que JAT 238. No final da semana de re-hidratação (dia 22), os dois ecótipos apresentam valores de fotossíntese semelhantes (Figura 4). Em situação controlo, JAT 08 e JAT 238 exibem valores constantes de A, com a linha 08 a evidenciar uma taxa de fotossíntese ligeiramente superior à linha 238, com excepção de dia 20.

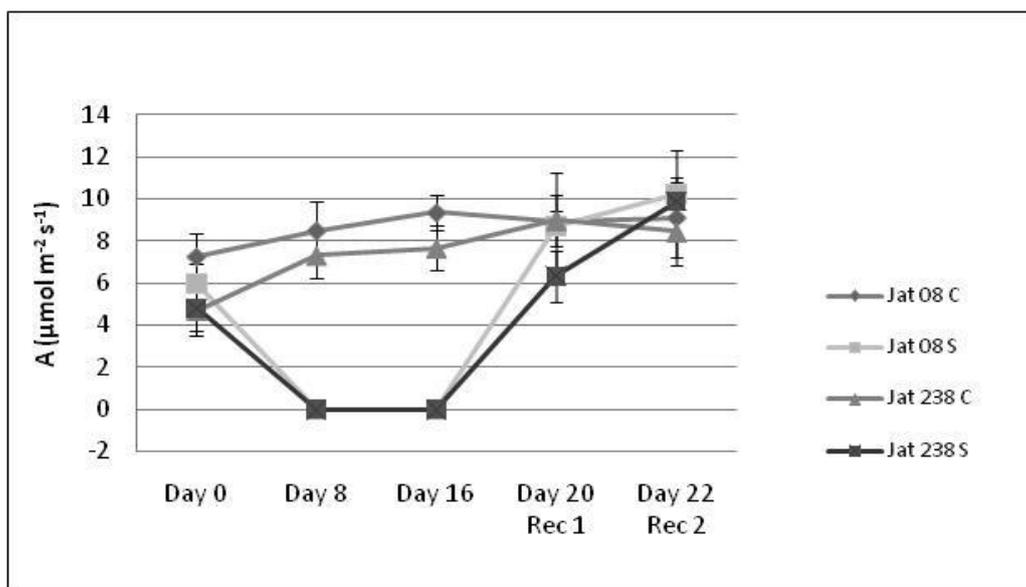


Figura 4. Variação da taxa de fotossíntese (A) ao longo do período da experiência. Cada ponto corresponde aos dias onde foram efectuadas as amostragens. O valor de cada ponto representa a média ($n=5$) \pm SD das plantas utilizadas para a recolha das amostras. Os valores foram registados ao dia 0, dias 8 e 16 de secura, e aos dias 20 e 22 da semana de re-hidratação.

O nível de condutância estomática (gs) registado ao longo da experiência, nas duas linhas em estudo, mostra um comportamento semelhante ao que foi registado para a taxa de fotossíntese. Os ecótipos JAT 08 e JAT 238, em situação controlo, têm valores semelhantes dia 0. O mesmo não se verifica nas plantas que vão ser sujeitas a stress hídrico. Ao fim de uma semana de secura, as plantas mostram valores muito baixos de gs. Esta situação não se verifica nas plantas controlo, onde ao longo do período da experiência a taxa de condutância sofre pequenas oscilações, com JAT 08 a apresentar valores mais elevados, excepto no dia 20. De salientar que, em conformidade com o aumento de A nas plantas em secura durante o período de re-hidratação, gs mostra o mesmo padrão comportamental nas duas linhas (Figura 5).

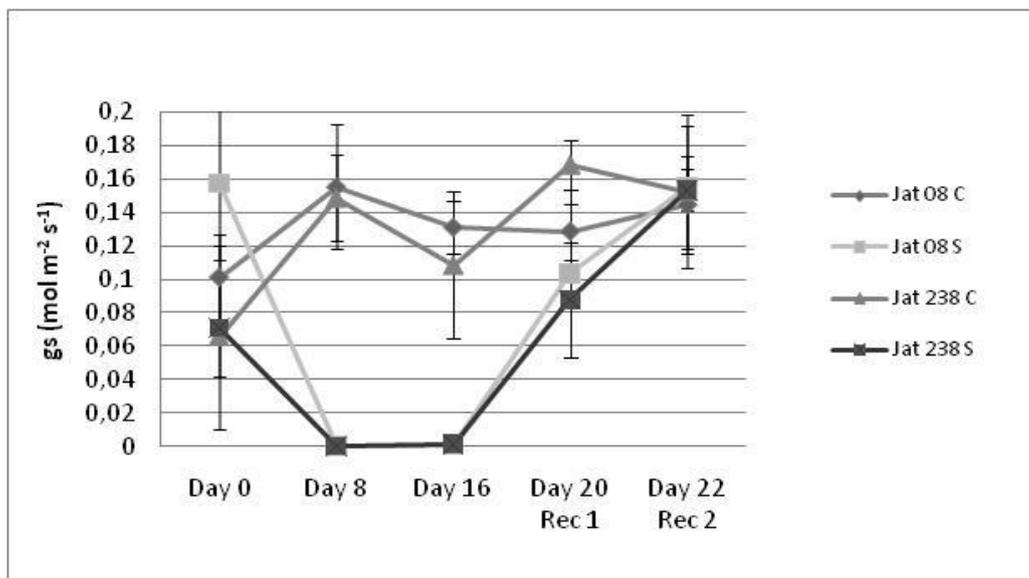


Figura 5. Variação da taxa de condutância estomática (g_s) ao longo do período da experiência. Cada ponto corresponde aos dias onde foram efectuadas as amostragens. O valor de cada ponto representa a média ($n=5$) \pm SD das plantas utilizadas para a recolha das amostras. Os valores foram registados ao dia 0, dias 8 e 16 de secura, e aos dias 20 e 22 da semana de re-hidratação.

A eficiência do fotossistema II (Φ_{PSII}), como a condutância estomática e a taxa de fotossíntese, sofre uma redução significativa nas plantas das duas linhas, quando estas são sujeitas a um período de stress hídrico. As plantas controlo dos ecótipos JAT 08 e JAT 238 mantêm o nível de eficiência do fotossistema II ao longo do tempo. JAT 08 apresenta quase sempre níveis um pouco superiores a JAT 238, com excepção no dia de secura máxima (dia 16). As plantas sob stress hídrico, após o período de secura máxima, recuperam os valores lentamente até ao segundo dia de re-hidratação, seguido de uma fase de recuperação mais rápida entre o segundo dia (dia 20) e o quarto dia (dia 22) de re-hidratação. Na fase de recuperação mais lenta, o ecótipo JAT 08 possui um valor de Φ_{PSII} mais elevado que JAT 238. No quarto dia de recuperação, os índices de eficiência do fotossistema II são quase iguais entre as duas linhas de *Jatropha curcas* (Figura 6).

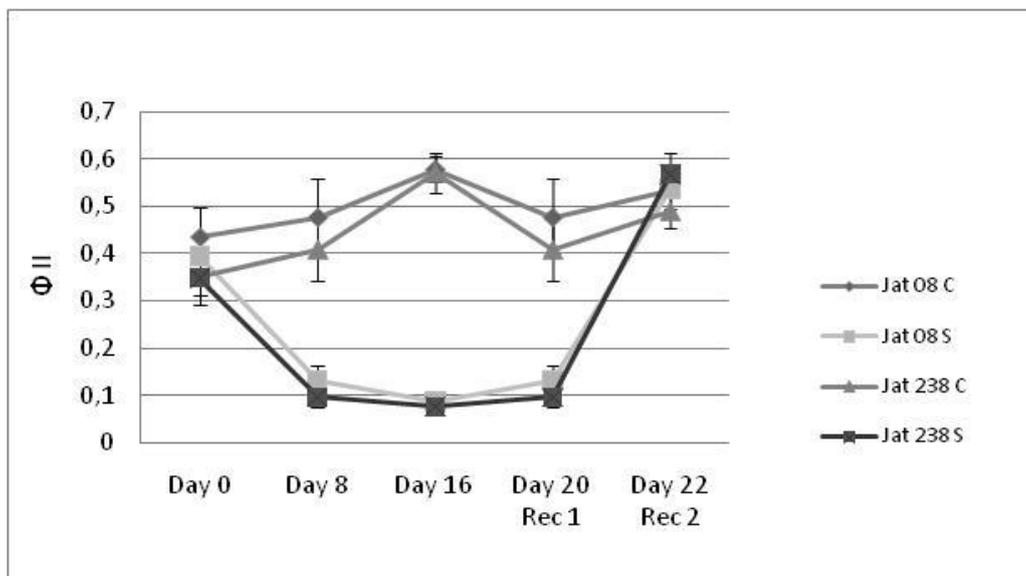


Figura 6. Variação da eficiência do fotossistema II (ϕ PSII) ao longo do período da experiência.

Cada ponto corresponde aos dias onde foram efectuadas as amostragens. O valor de cada ponto representa a média ($n=5$) \pm SD das plantas utilizadas para a recolha das amostras. Os valores foram registados ao dia 0, dias 8 e 16 de seca, e aos dias 20 e 22 da semana de re-hidratação.

O último dos parâmetros analisados, inferido através das medições feitas pelo equipamento IRGA, foi a eficiência no uso da água (WUE). Este parâmetro sugere que os dois ecótipos da planta possuam formas um pouco diferentes de utilizar a água absorvida. Em situação controlo, parece que JAT 238 apresenta um índice de eficiência no uso da água superior ao longo do período do ensaio. JAT 08 mostra um nível semelhante, sendo mais elevado no dia 16. Durante o período de seca, e no período de recuperação, a linha 238 apresenta na maioria do tempo níveis um pouco superiores à linha 08. Este facto que é mais visível nos dias 0 e 20. No último dia da semana de re-hidratação, as plantas já apresentam um comportamento semelhante ao da situação controlo, embora JAT 238 seja ligeiramente superior (Figura 7).

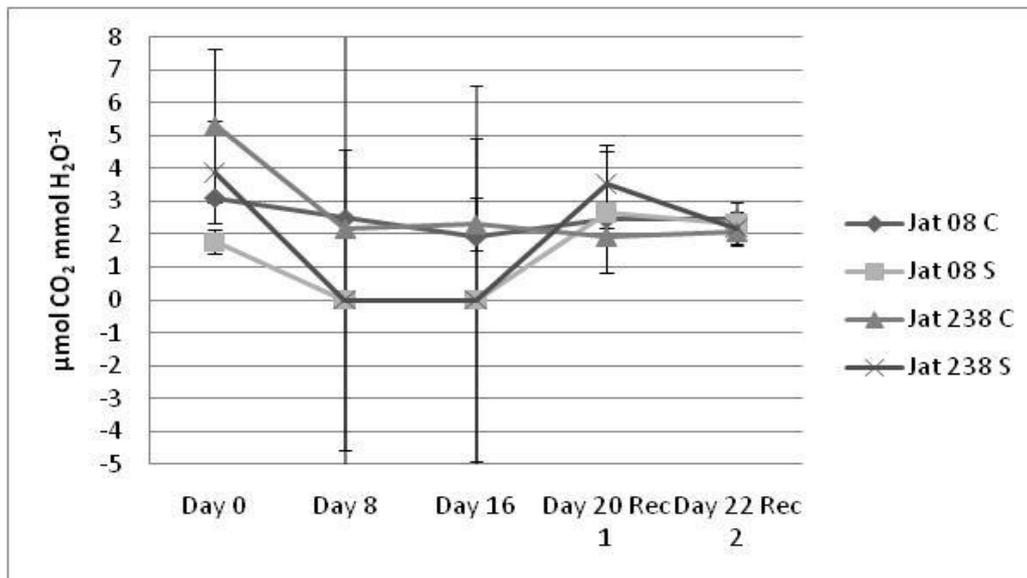


Figura 7. Variação da eficiência no uso da água (WUE) ao longo do período da experiência. Cada ponto corresponde aos dias onde foram efectuadas as amostragens. O valor de cada ponto representa a média ($n=5$) \pm SD das plantas utilizadas para a recolha das amostras. Os valores foram registados ao dia 0, dias 8 e 16 de secura, e aos dias 20 e 22 da semana de re-hidratação.

4.4.2 Dados morfológicos

Os dados obtidos através das medições efectuadas em diferentes partes da planta, permitiram avaliar o crescimento das duas linhas de *Jatropha curcas L.* em função do stress hídrico, assim como em situação controlo. Os parâmetros analisados foram o diâmetro do caule, o número de novas folhas e o comprimento e largura das folhas. Os dados estão apresentados na Tabela 6.

Diâmetro do Caule (cm)

Dias Trat.	Linha JAT 08		Linha JAT 238		p value	Signf.	JAT 08S/ JAT 238S	
	Controlo	Secura	Controlo	Secura			P value	Signf.
Dia 0	0,50 \pm 0,07	0,54 \pm 0,05	0,56 \pm 0,05	0,52 \pm 0,04	0,44	n.d.	0,44	n.d.
Dia 8	0,62 \pm 0,04	0,54 \pm 0,05	0,62 \pm 0,08	0,56 \pm 0,05	1	n.d.	0,57	n.d.
Dia 16	0,74 \pm 0,05	0,54 \pm 0,05	0,70 \pm 0,07	0,59 \pm 0,02	0,34	n.d.	0,09	n.d.
Dia 22	0,82 \pm 0,03	0,59 \pm 0,04	0,78 \pm 0,08	0,60 \pm 0,04	0,33	n.d.	0,64	n.d.

Comprimento da folha (cm)

Dias Trat.	Linha JAT 08		Linha JAT 238		<i>p</i> value	Signf.	<i>P</i> value	Signf.
	Controlo	Secura	Controlo	Secura				
Dia 0	6,12±2,29	7,68±1,68	5,48±1,78	5,16±0,85	0,05	*	0,05	*
Dia 8	8,40±1,13	7,86±1,28	7,20±1,02	5,26±0,76	0,14	n.d.	0,004	*
Dia 16	8,46±1,39	7,92±1,29	7,80±0,76	5,22±0,82	0,38	n.d.	0,004	*
Dia 22	8,94±1,00	8,26±1,34	7,82±0,66	6,02±0,84	0,06	n.d.	0,01	*

Largura da folha (cm)

Dias Trat.	Linha JAT 08		Linha JAT 238		<i>p</i> value	Signf.	<i>P</i> value	Signf.
	Controlo	Secura	Controlo	Secura				
Dia 0	5,48±2,15	7,38±1,11	4,94±1,43	4,56±1,21	0,03	*	0,03	*
Dia 8	7,70±1,17	7,42±1,05	6,64±0,75	4,72±1,18	0,12	n.d.	0,005	*
Dia 16	7,86±1,40	7,38±1,09	7,06±0,61	4,72±1,18	0,27	n.d.	0,006	*
Dia 22	8,24±1,04	7,92±0,95	7,30±0,58	5,50±1,06	0,11	n.d.	0,005	*

Número de folhas (#)

Dias Trat.	Linha JAT 08		Linha JAT 238		<i>p</i> value	Signf.	<i>P</i> value	Signf.
	Controlo	Secura	Controlo	Secura				
Dia 0	3,80±0,84	3,20±0,45	4,00±0,00	3,60±0,55	0,26	n.d.	0,26	n.d.
Dia 8	4,60±1,14	3,60±0,55	4,20±0,45	3,60±0,55	0,48	n.d.	1	n.d.
Dia 16	4,80±0,84	3,60±0,55	4,40±0,55	3,60±0,55	0,39	n.d.	1	n.d.
Dia 22	5,00±1,00	4,20±0,45	4,60±0,55	3,80±0,45	0,45	n.d.	0,19	n.d.

Tabela 6. Análise não invasiva do comprimento do caule, número de folhas, comprimento e largura das folhas, entre plantas das linhas JAT 08 e JAT 238, em condições de controlo e de stress hídrico. Diferenças entre as duas linhas, em situação controlo e de stress hídrico, ao longo do tempo. São apresentadas as tabelas referentes ao comprimento do caule, número de folhas, comprimento e largura das folhas. Os valores medidos foram registados, para os diferentes parâmetros, no dia 0, dias 8 e 16 de secura, e no dia 22, após uma semana de re-hidratação. Os valores apresentados correspondem à média ($n=5$) \pm SD. Significância estatística, presente no crescimento entre os dois ecótipos ao longo do tempo, foi avaliado por *t*-student ($p<0,05$).

A recolha dos dados de aspectos morfológicos não invasivos foi efectuada em folhas jovens das duas linhas (terceira folha mais nova), e na parte caulinar das plantas, submetidas aos dois tipos de tratamento. Os valores obtidos mostram que, em situação de secura, o diâmetro do caule em JAT 238 continua a aumentar lentamente, ao passo que a linha JAT 08 apresenta uma supressão do crescimento caulinar, durante o período de stress. Após este período, ocorre a recuperação do crescimento do caule da linha JAT 08. Em situação de controlo, os valores de crescimento do caule são constantes para as duas linhas, com JAT 238 a mostrar um crescimento mais lento que JAT 08.

O registo de novas folhas mostra que, em condições controlo, JAT 08 aparenta ter uma maior capacidade de produção de novas folhas do que o ecótipo JAT 238. Sob stress hídrico, as duas linhas bloqueiam o desenvolvimento de novas folhas. Após a re-hidratação, JAT 08 apresenta de novo uma capacidade para desenvolver novas folhas de forma mais célere que JAT 238.

Os resultados obtidos, no comprimento das folhas e na largura das folhas, devem ser vistos em conjunto. Desta forma, verifica-se que em situação controlo a largura e o comprimento das folhas cresce a um ritmo constante, com um aparente maior crescimento da linha 08 que da linha JAT 238. Em situação de secura, o crescimento da folha decorre a uma ritmo muito inferior, que acaba no dia de máxima secura (dia 16), onde para. Após a re-hidratação, o crescimento da largura é de novo visível, com o ecótipo JAT 08 a ser ligeiramente superior.

4.4.3 Dados de RWC , densidade estomática, tamanho das raízes, peso seco, e de teor de clorofila

Foram efectuados ensaios para analisar alterações no RWC, no teor de clorofila, ainda e na densidade estomática em folhas dos dois ecótipos em estudo. Pretendíamos observar o padrão de resposta das duas linhas de *Jatropha curcas* L., em situação de stress hídrico, por estes parâmetros. Pretendíamos igualmente avaliar, entre as duas linhas, diferenças que poderiam existir e verificar se alguma delas poderia ter uma resposta mais eficiente à seca. Tentámos igualmente avaliar se existiam diferenças entre os dois ecótipos, no tamanho das raízes, após serem submetidas a um período de stress hídrico, assim como no seu peso seco. Os dados não foram conclusivos, não sendo por isso apresentados neste trabalho.

5 Discussão

Com este trabalho, pretendeu-se estudar duas linhas da planta *Jatropha curcas* (uma de clima árido e outra de clima tropical), estabelecendo comparações entre elas, com base em dados morfo-fisiológicos e em dados moleculares. Com estes dados, tentámos verificar qual das duas linhas possui uma maior capacidade de tolerar um período de secura. Tentámos também perceber um pouco mais da fisiologia de *Jatropha curcas* L., até à data pouco caracterizado.

5.1 Identificação e isolamento dos genes putativos *ABI*, *ABF 1 e 2*, e *T6PS* de *Jatropha curcas* L.

Os genes isolados neste trabalho, *ABI*, *ABF 1 e 2*, e *T6PS* (putativos), em *Jatropha curcas*, apresentam identidades acima dos 65% com as sequências de *Ricinus communis*, obtidas por comparação com genoma desta espécie (Chan *et al.*, 2008). Utilizando o mesmo processo, foram obtidos valores semelhantes para *Populus trichocarpa*. Com os valores de identidade obtidos, e embora as sequências do genoma de *R. communis* e *P. trichocarpa* sejam também putativas, temos uma boa indicação de que as sequências isoladas em *Jatropha curcas* L. são, muito provavelmente, as dos genes pretendidos. De salientar que a construção dos primers degenerados funcionou como esperado, excepto no isolamento dos genes da família *CBF*, em que as bandas amplificadas, após sequenciação, provaram não corresponder aos genes *CBF*. Este facto pode ser devido a um emparelhamento inespecífico dos primers degenerados com o cDNA, visto que das ampliações obtidas, apenas uma era referente a um gene de planta, o gene *ABI* putativo. Dado que este gene não pertence à mesma família génica e proteica de *CBF*, o emparelhamento inespecífico poderá ser um dos factores que influenciou a falha no processo de isolamento dos genes *CBF*. Para amplificar os genes *CBF* de *J. curcas*, é aconselhável testar novos primers degenerados.

Um outro aspecto que não foi possível concluir durante este trabalho, foi o isolamento das regiões 5' dos genes *ABI*, *ABF 1 e 2*, e *T6PS* (putativos). O protocolo de isolamento seguido neste trabalho tem sido utilizado no laboratório, com sucesso (Pedro Barros, comunicação pessoal, 2010). Devem existir falhas no processo de

síntese das extremidades, que possam estar a interferir com a amplificação e identificação da região 5' dos genes em estudo. É possível que alguns enzimas também não estejam a funcionar como seria expectável, já que foram assinalados alguns outros problemas de amplificação com outros materiais vegetais.

5.2 Estudo de expressão génica

Neste trabalho, procurámos identificar diferenças de expressão génica entre os dois ecótipos em estudo. Com esse objectivo, foram utilizados genes já descritos em *Jatropha curcas* L, como envolvidos na resposta ao stress hídrico, e os genes candidatos isolados neste trabalho, descritos em muitas outras plantas como parte do mecanismo de resposta à secura, em diferentes níveis (Bartels e Sunkar, 2005; Saibo *et al.* 2009; Singh *et al.* 2002; Luu e Murel, 2005; Bargmann e Munnik, 2006; Wingler, 2002; Schweighofer *et al.*, 2004).

A expressão de *JcERF*, parece apresentar um aumento de expressão durante o período de stress hídrico. Em outras plantas modelo, como *Arabidopsis thaliana*, foram realizados ensaios de stress hídrico em períodos de horas, com genes desta família, onde se verificou o seu papel na resposta à secura (Fujimoto *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001). Noutro ensaio de secura, efectuado por Tang *et al.* (2007) numa linha diferente de *Jatropha curcas*, foi obtido por Northern blotting um padrão de resposta em crescendo. Este padrão em crescendo, foi igualmente obtido. em JAT 08 e JAT 238. Apesar disso, este autor realizou o ensaio de secura num período de 24 horas, e com a indução de stress a ser efectuada com PEG 20%. Pelo facto de a linha de *J. curcas* e do tempo de ensaio serem diferentes, não se podem retirar ilações conclusivas. Podemos considerar que um ensaio de secura com o mesmo tipo de indução de stress do efectuado neste trabalho, mas no espaço de 24 horas, seria aconselhado para verificar se este padrão de expressão ocorre nos ecótipos JAT 08 e 238. Em situação controlo, a linha JAT 08 apresenta um padrão de expressão igual ao demonstrado sobre stress hídrico. Da mesma forma, JAT 238 apresenta uma expressão constante ao longo do tempo. Os genes da família AP2/ERF, devido ao facto de estarem envolvidos na resposta a diferentes tipos de stress (Gutterson e Reuber, 2004), podem ser expressos nas plantas devido a diferentes estímulos. Este facto pode explicar o padrão de expressão encontrado nas plantas controlo.

O gene *JcPLD*, em JAT 08 e JAT 238, apresenta um padrão de resposta semelhante, quer em situação controlo, quer em secura. A expressão constante em controlo, revelada pelos dois ecótipos, pode estar relacionada com o seu papel como transdutor de diversos sinais (Wang, 2000). Quando foi induzido stress hídrico nas duas linhas, ambas sofreram um aumento de expressão de igual intensidade, o que parece relevar um papel deste gene na resposta a este stress abiótico. Devido ao papel da proteína PLD no controlo do fecho estomático, talvez fosse de esperar uma maior expressão de *JcPLD* durante o período de stress hídrico. Esta resposta enquadra-se na que tinha sido obtida para outra linha de *Jatropha curcas* (Liu *et al.*, 2010), assim como em outras plantas modelo (Hong *et al.*, 2008; Sang *et al.*, 2001). No trabalho efectuado por Liu *et al.* (2010), apenas é indicada a existência de plantas sobre stress, e não o tempo em que decorreu a indução. Desta forma, é difícil estabelecer um comparativo com os resultados obtidos neste trabalho. Apesar disso, e do grande número de moléculas envolvidas na regulação estomática (Taiz e Zeiger, 2000), o resultado obtido pode-se considerar dentro do expectável.

Os níveis de expressão de *JcPiP2*, registados neste trabalho, mostram igualmente uma resposta semelhante dos ecótipos JAT 08 e JAT 238, ao stress hídrico. Sob stress hídrico, o padrão de expressão parece ser igual, com uma redução durante o período de stress, e com uma subida após a re-hidratação. A redução da expressão de aquaporinas nas folhas, já foi demonstrada em plantas modelo, o que fortalece este resultado (Alexandersson *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006). Esta poderá ser uma resposta da planta ao stress hídrico, onde uma redução das aquaporinas nas folhas pode levar a uma redução das perdas de água por transpiração. Noutra linha de *J. curcas*, num trabalho realizado por Zhang *et al.* (2007), a expressão de *JcPiP2* em secura é reduzida, embora o ensaio tenha sido realizado com raízes. Este facto limita possíveis comparações com as linhas em estudo neste trabalho. Em controlo, no entanto, é possível observar algumas variações na expressão de *JcPiP2* nos dois ecótipos. Este facto, apesar do padrão de expressão em secura ser semelhante ao que já foi demonstrado noutras plantas, não permite inferir totalmente o papel que este gene tem em secura.

O gene *T6PS*, nas duas linhas, apresenta em controlo uma variação de expressão que não era expectável, principalmente na linha JAT 08. Sob stress hídrico, ambos os ecótipos apresentam uma redução aos dias 8 e 16 de secura. Esta redução,

durante o período de stress, pode estar relacionada com o bloqueio total do crescimento das duas linhas em secura, como ficou registado em alguns dos dados morfológicos recolhidos neste trabalho. Isto porque a trealose está envolvida no controlo do metabolismo no desenvolvimento da planta (Avonce *et al.*, 2004; Cortina e Calfañez-Macià, 2005; Schulepman *et al.*, 2003), onde a sua sobre-expressão deu origem a plantas sobre-desenvolvidas, e ainda à morfologia celular alterada (Chary *et al.*, 2008; Veyres *et al.*, 2008). Durante uma época seca, é possível que *J. curcas* induza uma diminuição na expressão de *T6PS*, de forma a reduzir o seu crescimento.

A expressão de *ABF 1*, e de *ABF 2*, mostram que não existem diferenças significativas no padrão de expressão entre os dois ecótipos, em situação de secura e em situação controlo. Esta ausência de variação nos dois genes, entre o estado de stress hídrico e o estado de secura, pode indicar que estes genes, putativamente *ABF 1* e *ABF 2*, sejam na verdade outros genes. Devido ao facto de a sua taxa de homologia ser a baixa entre os genes isolados, podemos estar perante outro gene da família ABF, com a qual partilhem grande similaridade.

Para além disso, o facto de estes genes terem um padrão de expressão que apresenta oscilações muito pequenas, pode indicar que a sua regulação não seja efectuada ao nível da transcrição, mas a um nível pós-traducional. Este facto, pode ser extrapolado para alguns dos genes analisados neste trabalho, visto que muitos apresentam um padrão de expressão semelhante entre controlo e secura, nos dois ecótipos.

O último dos genes a ser isolado, *ABI*, mostra que em situação controlo a expressão deste gene é constitutiva ao longo do tempo para o ecótipo JAT 238, mas com pequenas oscilações em JAT 08. No entanto, em stress hídrico, os dois ecótipos parecem apresentar um forte controlo estomático, com a expressão de *ABI* a ter uma redução, o que se reflecte no baixo nível de condutância e fotossíntese, registado nos ensaios fisiológicos. Visto que gene regula negativamente o sinal de ABA, que leva à abertura estomática (Assmann *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004), o padrão de expressão apresentado sob stress hídrico pode estar possivelmente dentro do esperado.

Ao analisar os padrões de todos os genes nos dois ecótipos, em controlo e em secura, verifica-se que em JAT 08 as oscilações de expressão parecem ser maiores do que em JAT 238. Estes dados, em conjunto com os resultados obtidos nos ensaios fisiológicos, que mostram que JAT 238 possui o melhor índice de WUE, podem

indiciar que as oscilações em JAT 08 são provocada por stress prematuro. Como este ecótipo tem um WUE baixo, pode ocorrer que esta linha absorva a maioria da água presente na terra, e que, ao começar a ficar sem a mesma, comece a responder a um ligeiro stress hídrico. Esta é uma explicação plausível para o que se observa neste padrão de expressão.

Outros factores podem influenciar os resultados de expressão génica, como problemas de pipetagem. Para além disso, as amostras neste trabalho são demonstrativas da expressão num determinado dia ao longo de um mês, não durante um período curto. Pode haver oscilações de expressão de alguns genes em *J. curcas* que não são possíveis de detectar neste trabalho, e que influenciam a sua expressão final. Para além disso, as condições do protocolo experimental poderiam não ser as mais adequadas, assim como o material utilizado (ex. vasos utilizados muito pequenos).

De modo a complementar estes ensaios de expressão génica, seria adequado realizar ensaios *in vivo*, numa planta modelo como *Arabidopsis thaliana*. Através da transformação destas plantas com os genes isolados, poder-se-á efectuar a caracterização funcional dos genes isolados, e uma comparação dos genes das duas linhas, do ponto de vista fenotípico.

5.3 Estudo de dados fisiológicos

Nos dois ecótipos estudados, JAT 08 e JAT 238, a taxa de fotossíntese (A) e a condutância estomática (gs) sofreram, durante o período de secura, uma redução acentuada. Os valores registados apontam para um controlo estomático apertado, dados que aparentam ser corroborados pela análise de expressão génica efectuada neste trabalho, assim como por dados experimentais registados em *Jatropha curcas* (Pompelli *et al.*, 2010; Maes *et al.*, 2009a). Um controlo estomático deste tipo pode ser fruto de uma estratégia da planta para não perder água. Pensa-se que *J. curcas* pode ter um sistema fotossintético misto, passando de C3 para CAM, conforme a disponibilidade de água, como acontece em algumas plantas (Maes *et al.*, 2009a; Lüttge, 2008). Este facto explica que a planta feche os seus estomas completamente durante o dia, e só os abra à noite, como as plantas CAM, de forma a evitar percas de água. Seria benéfico, para um trabalho futuro, realizar recolhas de dados durante a

noite, para verificar se esta hipótese é viável e se ocorre abertura estomática durante o período noturno. Também seria importante fazer medições com maior frequência, de forma a acompanhar o fecho estomático. Desta forma seria possível verificar se existe diferença entre as duas linhas e o tempo de resposta dos estomas.

Sabe-se que as variedades de *J. curcas*, existentes na região de onde provem, preferem um clima mais húmido do que seco (Maes *et al.*, 2009b). A linha JAT 08, em controlo, apresenta sempre valores mais elevados de A e de gs do que a linha JAT 238, o que pode estar relacionado com sua origem. Uma planta de um clima tropical, pode realizar mais fotossíntese, e consumir mais água, visto não haver falta deste recurso. Para além disso, pode produzir mais biomassa, e utilizar os seus recursos nessa função. O mesmo não se verifica em plantas provenientes de um clima árido, onde a falta de água implica um controlo no gasto da mesma. Estas diferenças de A e gs são verificadas noutras partes do globo (Saikia *et al.*, 2009), o que prova a plasticidade do genoma da purgueira. Esta análise é também visível através do WUE, analisado neste trabalho, onde se prova que o uso de água de JAT 238 é um pouco melhor do que de JAT 08, provavelmente devido à sua adaptação ao meio árido. O tipo de resposta das duas linhas, na situação de stress hídrico provocada, está dentro do esperado, como demonstrado num ensaio semelhante (Pompelli *et al.*, 2010).

O ecótipo JAT 08, neste trabalho, parece apresentar uma capacidade de fotossintetizar de uma forma mais eficaz, e com uma recuperação mais rápida da sua eficiência fotossintética. Esta propriedade foi avaliada pelo parâmetro Φ_{PSII} , no ensaio de stress hídrico realizado. A redução da eficiência do fotossistema II, verifica-se em outras espécies, quando submetidas a stress hídrico (Colom e Vazzana, 2003; Loggini *et al.*, 1999). Este facto tem sido encarado com uma resposta das espécies que estão mais habituadas à seca, em que não procuram aumentar a eficiência do seu fotossistema, pois podem correr o risco de haver novo stress hídrico, o que pode resultar em dano oxidativo (Yordanov *et al.*, 2000; Colom e Vazzana, 2003). Podemos então considerar a hipótese de que *Jatropha curcas*, como estratégia de adaptação ao local onde se desenvolve, use este mecanismo, de forma a superar as condições ambientais que são apresentadas. O ecótipo JAT 238 apresentou valores de Φ_{PSII} um pouco mais reduzidos do que JAT 08, o que pode indiciar ser este um dos mecanismos de tolerância à secura. Para além disso, este facto pode significar que este

ecótipo reduz a eficiência do seu fotossistema, pela sua adaptação a climas mais áridos.

5.4 Estudo dos dados morfológicos

Algumas diferenças morfológicas têm sido verificadas para *Jatropha curcas* L. em diferentes trabalhos (Maes *et al.*, 2009a; Saikia *et al.*, 2009; Mugta e Murthy, 2008). No trabalho aqui apresentado, a linha 238 e a linha 08 parecem apresentar diferentes estratégias de resposta à secura. Integrando os dados do comprimento e da largura de folha, e do número de folhas, parece que o ecótipo JAT 238 aumenta a área das folhas que possui, enquanto que JAT 08 parece apostar em desenvolver novas folhas. Apesar disso, a área foliar e o ritmo de crescimento do ecótipo JAT 08 é superior a JAT 238. Para além disso, quando se dá a re-hidratação das plantas em secura, a linha JAT 08 aumenta de tamanho mais depressa do que JAT 238. Maes *et al.* (2009a) verificaram que *J. curcas*, em situação de seca, potencia o crescimento de novas folhas. Neste trabalho, este facto apenas foi verificado para uma das linhas. Mesmo assim, o aparecimento de novas folhas, em JAT 08, só acontece quando a planta é sujeita a re-hidratação. Um bloqueio no crescimento de novas folhas, e da planta em geral, é algo generalizado pelo reino vegetal em situação de stress hídrico (Taiz e Zeiger, 2000; Chaves *et al.* 2002). As diferenças verificadas, entre os ensaios, podem ser explicadas pelo facto de estes terem sido feitos com linhas diferentes, e em condições diferentes, o que pode ter contribuído para as diferenças nos dados. Da mesma forma, no ensaio de Maes *et al.* (2009a), após uma semana de secura, as folhas começaram a cair, o que não sucedeu no ensaio aqui descrito.

Também se registou um aumento no diâmetro do caule, em JAT 238, que não ocorre em JAT 08. Este alargamento pode ser devido à acumulação de água, que esta linha induz, de forma a utilizar esta água mais tarde, como já foi descrito para plantas suculentas (Chapotin *et al.*, 2006), ou para evitar a desidratação, como se parece verificar nos ecótipos analisados. Maes *et al.* (2009a), com base nos seus resultados, sugerem que *Jatropha curcas* gaste a água acumulada no caule, para continuar a produzir folhas. Os nossos resultados não apontam nessa direcção. Visto que nas linhas em estudo, a sua proveniência e o tipo de tratamento foram diferentes, pode estar neste facto a resposta, apesar de esta teoria ser rejeitada por dados obtidos num

trabalho recente (Achten *et al.*, 2010). Neste trabalho, a dimensão das sementes de *J. curcas* é visto como o factor que mais influencia o crescimento da planta durante a resposta ao stress hídrico, e não a sua proveniência. São necessários mais estudos sobre *Jatropha curcas*, e sobre as suas variedades, para aumentar o conhecimento relativamente a estratégia desta espécie para lidar com stress, neste caso, stress hídrico.

Não foi possível obter dados de nenhum dos outros parâmetros morfológicos analisados. Os resultados obtidos foram díspares, com oscilações de valores entre os dois ecótipos, e entre os dois tratamentos aplicados. Para o caso do teor de clorofila, já foi feito um estudo semelhante em *J. curcas*, mas em plantas com cerca de 2 anos (Pompelli *et al.*, 2010), onde se verificou um decréscimo na concentração de clorofila em função do stress hídrico. Neste trabalho, os valores oscilaram muito, como nos outros parâmetros. Podemos concluir que, provavelmente, as condições do protocolo experimental não seriam as mais adequadas. O material utilizado durante a experiência, assim como a idade da planta, podem também ter influenciado os resultados. O protocolo experimental deve ser revisto, de forma a que se possam retirar conclusões em futuros ensaios.

6 Conclusões e Perspectivas Futuras

No presente trabalho, pudemos verificar que as duas linhas de *Jatropha curcas* L. não apresentam grandes diferenças ao nível da expressão génica. Apesar de na expressão de alguns genes se observarem pequenas flutuações em fases diferentes da experiência, não se verificou nenhuma alteração clara que indicie um padrão específico de expressão de uma linha em relação à outra. Podemos observar nas duas linhas que, presumivelmente, apenas os genes *ABI* e *T6PS* possuem um padrão de resposta diferente em situação de secura, quando comparados com a situação controlo. A existência de alguns padrões idênticos entre stress e controlo indicia que, ou os genes de facto não apresentam diferenças de expressão, pelas razões apresentadas ao longo do texto, ou as condições em que as experiências foram conduzidas não foram as mais adequadas. É necessário compreender o modelo de actuação destes genes, assim como procurar outros genes que possam ter uma relação com aspectos fisiológicos. Estes ensaios são ainda preliminares, e destinam-se a averiguar as melhores condições para caracterizar as plantas de *Jatropha*, sobre as quais ainda não existe muito conhecimento, nem no laboratório de acolhimento, nem sequer a nível mundial.

Com este trabalho, foi possível concluir que as linhas de clima árido e seco parecem apresentar diferentes estratégias de desenvolvimento e resposta à secura. Fisiologicamente, as plantas da linha JAT 08 mostram uma melhor eficiência na taxa fotossintética e na condutância estomática, o que se parece verificar pelo seu maior crescimento em relação à outra linha, quando estão em condições controlo. Em situação de secura, este ecótipo bloqueia o seu crescimento. O ecótipo JAT 238 apresenta um crescimento baixo em situação controlo, mantendo o mesmo ritmo em situação de secura. Este comportamento parece evidenciar duas formas diferentes de lidar com a secura.

Não foi possível encontrar correlação entre a expressão génica e os padrões morfo-fisiológicos para nenhum dos genes em estudo. No entanto, pelos resultados obtidos no ensaio de expressão génica, parece existir alguma influência dos genes *ABI* e *T6PS* no mecanismo de resposta à secura em *Jatropha curcas*., devido ao papel que estes genes possuem na regulação do controlo estomático, e no crescimento da planta, respectivamente.

Seria importante realizar ensaios epigenéticos em genes-alvo, comparando as duas linhas, de forma a verificar se é através deste processo que se verificam as diferenças fenotípicas entre ambas. Apesar das dificuldades logísticas, seria igualmente importante realizar todos estes ensaios em plantas num estágio de maior desenvolvimento, para verificar potenciais alterações nos padrões de resposta.

Conclui-se que *Jatropha curcas* L., não apresenta, sob stress hídrico, grandes diferenças de expressão ao nível transcricional para os genes analisados. Esta situação pode dever-se ao facto da espécie estar distribuída por um espaço geográfico muito grande (aparentemente por responsabilidade dos Portugueses, durante os descobrimentos), sem contudo apresentar grande variabilidade genética (há grande variabilidade na região de origem, mas reduzida no resto do mundo) (P. van der Linde, comunicação pessoal, 2010). A resposta morfo-fisiológica contudo, apresenta diferenças mais marcadas, o que poderá eventualmente relacionar-se com a adaptação aos dois diferentes climas de onde as linhas foram obtidas.

7 Referências Bibliográficas

- Achten, W. M. J., Verchot, L., Franken, Y. J., Mathijs, E., Singh, V. P., Aerts, R., Muys, B. 2008. *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass and Bioenergy*. 32: 1063-1084
- Achten, W. M. J., Maes, Reubens, B., W. H., Mathijs, E., Singh, V. P., Verchot, L., Muys, B. 2010. Biomass production and allocation in *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. *Biomass and Bioenergy*. 34: 667-676
- Alexandersson, E., Fraysse, L., Sjövall-Larsen, S., Gustavsson, S., Fellert, M., Karlsson, M., Johanson, U., Kjellbom, P. 2005. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology*. 59: 469-484
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-410
- Anderson, W., Smith, B. M., Gustafson, J. 1994. Health benefits practical aspects of high-fiber diets. *American Journal of Clinical Nutrition*, 59: 1242-1249
- Assmann, S. M., Snyder, J. A., Lee, Y.-R. J. 2000. ABA-deficient (*aba1*) and ABA-insensitive (*abi1-1*, *abi2-1*) mutants of *Arabidopsis* have a wild-type stomatal response to humidity. *Plant, Cell and Environment*. 23: 387-395
- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., Iturriaga, G. 2004. The *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase *AtTPSI* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signalling. *Plant Physiology*. 136: 3649-3659
- Baker, N. R., Rosenqvist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*. 55: 1607-1621
- Baker, N. R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe to photosynthesis in vivo. *Annual Reviews in Plant Biology*. 59: 89-113
- Bargmann, B. O., Munnik, T. 2006. The role of phospholipase D in plant stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 9: 515-522
- Bargmann, B. O., Laxalt, A. M., ter Riet, B., van Schooten, B., Merquiol, E., Testerink, C., Haring, M. A., Bartels, D., Munnik, T. 2009. Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant & Cell Physiology*. 50: 78-89
- Bartels, D., Sunkar, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 24: 23-58
- Blázquez, M. A., Santos, E., Flores, C-M., Martínez-Zapater, J. M., Salinas, J., Gancedo, C. 1998. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* *TPSI* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *The Plant Journal*. 13: 685-689
- Borson, N. D., Salo, W. L., Drewes, L. R. 1992. A lock-docking oligo (dT) primer for 5' and 3' RACE PCR. *Genome research*. 2: 144-148

- Byun, Hi-R., White, D. A. 1999. Objective quantification of drought severity and duration. *Journal of Climate*. 12: 2747-2756
- Chan, A., Puiu, D., Melake, A., Orvis, J., Zhao, Q., Wortman, J., Utterback, T., Rosovitz, M. J., Inman, J. M., Amedeo, P., Schobel, S., Galinsky, K., Fraser, C., Ravel, J., Rabinowicz, P. Genome shotgun sequencing. Submitted in 22-10-2008. J. Craig Venture Institute.
- Chapotin, S. M., Razanameharizaka, J. H., Holbrook, N. M. 2006. Baobab trees (*Adansonia*) in Madagascar use stored water to flush new leaves but not to support stomatal opening before the rainy season. *New Phytologist*. 169: 549-559
- Chary, S. N., Hicks, G. R., Choi, Y. G., Carter, D., Raikhel. 2008. Trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase regulates cell shape and plant architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 146: 97-107
- Chaumont, F., Barrieu, F., Herman E. M., Chrispeels, M. J. 2000. Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiology*. 122: 1025-1034
- Chaves, M. M., Pereira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C. P. P., Osório, M. L., Carvalho, I., Faria, T., Pinheiro, C. 2002. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany*. 89: 907-916
- Chaves, M., Oliveira, M. M. 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*. 55: 2365-2384
- Chaves, M. M., Flexas, J., Pinheiro, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*. 103: 551-560
- Choi, H.-i., Hong, J.-h., Ha, J.-o., Kang, J.-u., Kim, S. Y. 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 1723-1730
- Cohen, P. T. W. 1997. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends in Biochemical Science*. 22: 245-251
- Colon, M. R., Vazzana, C. Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought-sensitive weeping lovegrass plants. *Environmental and Experimental Botany*. 49: 135-144
- Cortina, C., Calfañez-Macià, F. A. 2005. Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science*. 169: 75-82
- Easterling, D. R., Meehl, G. A., Parmesan, C., Changnon, S. A., Karl, T. R., Mearns, L. O. 2000. Climate extremes: observations, modeling and impacts. *Science*, 289: 2068-2073
- Fernandez, O., Béthencourt, L., Quero, A., Sangwan, R. S., Clément, C. 2010. Trehalose and plant stress responses: friend or foe?. *Trends in Plant Science*. 15: 409-417
- Fujimoto, S. Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., Ohme-Takagi, M. 2000. *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *The Plant Cell*. 12: 393-404

- Garg, A. K., Kim, J-K., Owens, T. G., Ranwala, A. P., Choi, Y. D., Kochian, L. V., Wu, R. J. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 15898-15903
- Gehrig, H. H., Winter, K., Cushman, J., Borland, A., Taybi, T. 2000. An improved isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Report*. 18: 369-376
- Glantz, M. H. 1988. Drought and hunger in Africa: denying famine a future. Cambridge University Press. Printed in Great Britain
- Goddijn, O. J. M., van Dun, K. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends in Plant Science*. 4: 315-319
- Gosti F., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A. A. R., Vartanian, N., Giraudat, J. 1999. ABI1 Protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *The Plant Cell*. 11: 1897-1909
- Guo, L., Wang, Z. Y., Lin, H., Cui, W. E., Chen, J., Liu, M., Chen, Z. L., Qu, L. J., Gu, H. 2006. Expression and functional analysis of the rice plasma-membrane intrinsic protein gene family. *Cell Research*. 16: 277-286
- Gutterson, N, Reuber, T. L. 2004. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 465-471
- Heller, J. 1996. Physic Nut *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and the use of underutilized neglected crops. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome
- Himmelbach. A., Hoffmann, T., Leube, M., Hohener, B., Grill, E. 2002. Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*. 21: 3029-3038
- Hong, Y., Pan, X., Welti, R., Wang, X. 2008. Phospholipase D α 3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 20: 803-816
- Hsieh, T-H., Lee, J-t., Charng, Y-y., Chan, M-T. 2002. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiology*. 130: 618-626
- Jones, H. D. 1998. Stomatal control of photosynthesis and transpiration. *Journal of Experimental Botany*. 49: 387-398
- Kang, J. Y., Choi, H. I., Im, M. Y., Kim, S. Y. 2002. *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell*. 14: 343-357
- Karim, S., Aronsson, H., Ericson, H., Pirhonen, M., Leyman, B., Welin, B., Mantyla, E., Palva, E. T., van Dijk, P., Holmstrom, K-O. 2007. Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. *Plant Molecular Biology*. 64: 371-386
- Kheira, A. A. A., Atta, N. M. M. 2009. Response of *Jatropha curcas* L. to water deficits: yield, water use efficiency and oilseed characteristics. *Biomass and Bioenergy*. 33: 1343-1350

- Kim, S. Y. 2006. The role of the ABF family bZIP class transcription factors in stress response. *Physiologia Plantarum*. 126: 519-527
- Kumar, A., Sharma, S. 2008. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. *Industrial Crops and Products*. 28: 1-10
- Lal, R. 2009. Soil degradation as a reason for inadequate human nutrition. *Food Security*, 1(1): 45-57
- Leyman, B., Van Dijck, P., Thevelein, J. M. 2001. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science*. 6: 510-513
- Li, M., Hong, Y., Wang, X. 2009. Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1791: 927-935
- Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology*, 18: 350–382
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10: 1391-1406
- Liu, L., White, M. J., MacRae, T. H. 1999. Transcription factors and their genes in higher plants. *European Journal of Biochemistry*. 262: 247-257
- Liu, B., Yao, L., Wang, W., Gao, J., Chen, F., Wang, S., Xu, Y., Tang, L., Jia, Y. 2010. Molecular cloning and characterization of phospholipase D from *Jatropha curcas*. *Molecular Biology Report*. 37: 939-946
- Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E., Navari-Izzo, F. 1999. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiology*. 1091-1099
- Lüttge, U. 2008. Stem CAM in arborescent succulents. *Trees*. 22: 139-148
- Luu, D. -T., Maurel, C. 2005. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant, Cell and Environment*. 28: 85-96
- Maes, W. H., Achten, W. M. J., Reubens, B., Raes, D., Samson, R., Muys, B. 2009a. Plant-water relationships and growth strategies of *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. *Journal of Arid Environments*. 73: 877-884
- Maes, W. H., Trabucco, A., Achten, W. M. J., Muys, B. 2009b. Climate growing conditions of *Jatropha curcas* L. *Biomass and Bioenergy*. 33: 1481-1485
- Martre, P., Morillon, R., Barrieu, F., North, G. B., Nobel, P. S., Chrispeels, M. J. 2002. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiology*. 130: 2101-2110
- Mason, J. B., Bailes, A., Mason, K. E., Yambi, O., Jonsson, U., Hudspeth, C., Hailey, P., Kendle, A., Brunet, D., Martel, P. 2007. AIDS, drought, and child malnutrition in southern Africa. *Public Health Nutrition*, 8(6): 551-563

- Maurel, C., Javot, H., Lauvergeat, V., Gerbeau, P., Tournaire, C., Santoni, V., Heyes, J. 2002. Molecular physiology of aquaporins in plants. *International Review of Cytology*. 215: 105-148
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D. -T., Santoni, V. 2008. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology*. 59: 595-624
- McMichaels, A. J., Woodruff, R. E., Hales, S. 2006. Climate change and human health: present and future risks. *The Lancet*, 367(9513): 859-869
- Meinhard, M. 2002. The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signaling. *Planta*. 214: 775-782
- Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A., Giraudat, J. 2001. The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *The Plant Journal*. 25: 295-303
- MeyerK., Leube, M. P., Grill. E. 1994. A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 264: 1452-1455
- Mugta, N., Murthy, I. Y. I. N. 2008. Variability assessment in *Jatropha curcas* seed and oil quality for biodiesel suitability. *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 78: 509-512
- Muller, J., Boller, T., Wiemken, A. 1995. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Science*. 112: 1-9
- Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2006. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. *Physiologia Plantarum*. 126: 62-71
- Nicholls, N. 2004. The changing nature of Australian droughts. *Climate Change*. 63: 323-336
- Nilson, S., Assmann, S. M. 2007. The control of transpiration. Insights from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 143: 19-27
- Olsson, L. 1993. On the causes of famine – drought, desertification and market failure in the Sudan. *Ambio*, 22(6)
- Openshaw, K. 2000. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass and Bioenergy*. 19: 1-15
- Park, J. M., Park C. J., Lee, S. B., Ham, B. K., Shin, R., Paek, H. R. 2001. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2 type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *The Plant Cell*. 13: 1035-1046
- Piironen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. a, Toivo, J., Lampi, A-M. 2000. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7): 939-966
- Platz, J. A. 2002. A human disease indicator for the effects of recent global climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20): 1112506-12508

- Pompeii, M. F., Barata-Luís, R., Vitorino, H. S., Gonçalves, E. R., Rolim, E. V., Santos, M. G., Almeida-Cortez, J. S., Ferreira, V. M., Lemos, E. E., Endres, L. 2010. Photosynthesis, photoprotection and antioxidant activity of purging nut under drought deficit and recovery. *Biomass and Bioenergy*. 34: 1207-1215
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J. Z., Ghandehari, D., Sherman, B. K., Yu, G. -L. 2000. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*. 290: 2105-2110
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. 2000. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
- Saibo, N. J. M., Lourenço, T., Oliveira, M. M. 2009. Transcription factors and regulation of photosynthetic related metabolism under environmental stress. *Annals of Botany*. 103: 609-623
- Saikia, S. P., Bhau, B. S., Rabha, A., Dutta, S. P., Choudhari, R. K., Chetia, M., Mishra, B. P., Kanjilal, P. B. 2009. Study of accession source variation in morpho-physiological parameters and growth performance of *Jatropha curcas* Linn. *Current Science*. 96: 1631-1636
- Sang, Y., Zheng, S., Li, W., Huang, B., Wang, X. 2001. Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase D α . *The Plant Journal*. 28: 135-144
- Schulepman, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S., Paul, M. Trehalose-6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 6849-6854
- Schweighofer, A., Hirt, H., Meskiene, I. 2004. Plant PP2C phosphatases: emerging role functions in plant stress. *Trends in Plant Science*. 9: 236-243
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 58(2): 221-227
- Singh, K. B., Foley, R. C., Oñate-Sanchez, L. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 430-436
- Slavin, J. 2004. Whole grains and human health. *Nutrition Research Reviews*, 17(1): 99-110
- Studel, E., Frensch, J. 1996. Water transport in plants: role of the apoplast. *Plant and Soil*. 187: 67-79
- Suárez, R., Wong, A., Ramírez, M., Barraza, A., Orozco, M. del C., Cevallos, M. A., Lara, M., Hernández, G., Iturriga, G. 2008. Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase *Rhizobia*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 21: 958-966
- Taiz, L. Zaiger, E. 2002. *Plant Physiology*. 3ª Edição. Sinauer Associates, Inc. Publ., Sunderland, Massachusetts
- Tallman, G. 2004. Are diurnal patterns of stomatal movement the result of alternating metabolism of endogenous guard cell ABA and accumulation of ABA delivered to the apoplast around guard cells by transpiration? *Journal of Experimental Botany*, 55 (405), 1963-1976.

- Tang, M., Sun, J., Liu, Y., Chen, F., Shen, S. 2007. Isolation and functional characterization of the JcERF gene, a putative AP2/EREBP domain-containing transcription factor, in the woody oil plant *Jatropha curcas*. *Plant Molecular Biology*, 63: 419-428
- Takezawa, D. 2003. Characterization of a novel plant PP2C-like protein Ser/Thr phosphatase as a calmodulin-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 38076-38083
- Tester, M., Bacic, A. 2005. Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. *Plant Physiology*. 137: 791-793
- Toenniessen, G., O'Toole, J. C., DeVries, J. 2003. Advances in plant biotechnology and its adoption in developing countries. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(2): 196-198
- Thompson, J. A. 2002. Research needs to improve agricultural productivity and food quality, with emphasis on biotechnology. *The Journal of Nutrition*. Additional Supplement: 3441-3442
- Tyerman, S. D., Niemietz, C. M., Bramley, H. 2002. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell and Environment*. 25: 173-194
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic-acid dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of The National Academy of Sciences*. 97: 11632-11637
- Veyres, N., Danon, A., Aono, M., Galliot, S., Karibasappa, Y. B., Diet, A., Grandmottent, F., Tamaoki, M., Lesur, D., Pilard, S., Boitel-Conti, M., Sangwan-Norreel, B. S., Sangwan, R. S. 2008. The *Arabidopsis* sweetie mutant is affected in carbohydrate metabolism and defective in the control of growth, development and senescence. *The Plant Journal*. 55: 665-686
- Waal, A. de, Whiteside, A. 2003. New variant of famine: AIDS and food crisis in southern Africa. *Lancet*. 362: 1234-1237
- Wang, X. 2000. Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions. *Progress in Lipid Research*. 39: 109-149
- Weatherly, P. E. 1950. Studies of the water relations of the cotton plant I. The field measurements of water deficits in leaves. *New Phytology*, 49:81-97
- Wilhite, D. A. 1993. The enigma of drought. *Drought assessment, management, and planning: theory and case studies*. D. A. Wilhite, Ed., Kluwer Academic. 3-15
- Wingler, A. 2002. The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry*. 60: 437-440
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2005. Organization of the *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive elements. *Trends in Plant Science*. 10(2): 89-93
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stress. *The Annual Review of Plant Biology*. 57: 781-803
- Yordanov, I., Velkova, V., Tsonev, T. 2000. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*. 38: 171-186

Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., Wang, X. 2004. Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101: 9508-9513

Zhang, Y., Wang, Y., Jiang, L., Xu, Y., Wang, Y., Lu, D., Chen, F. 2007. Aquaporin JcPIP2 is involved in drought responses in *Jatropha curcas*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(10): 787-794

8 Anexos


```

*      20      *      40      *      60      *
ABI      : ----- : -
Ricinus : GTTGGCTCTGGA AAAAGGGGCGGAGTGG AACAGTTC CA CGCAGTGT TTTTGA GGTGGAT TGTGTGCCCTCTC : 70
Populus : -----GAGGGAC CAGTGG AACAGTCT CA AAAAGTGT TTTTGA AGTGGATCTATCT ACCCTCT : 56
          aggg c agtggaacagt ca agtgtttttga gtgga t tgt cc ct

*      80      *      100     *      120     *      140
ABI      : -GGGGATTACATCTA TATGTGGAAGGAGACT -GAGATGGAAGATGCATTTGCAACTGTGC -TCAGTTTC : 67
Ricinus : TGGGGATTACCTCTA TATGTGGAAGGAGACCAGAGATGGAAGATGCATTTGCAACTGTGCCTCATTTC : 140
Populus : TGGGGATTACATCTG TTTGTGGAAGGAGCGCGGAGATGGAAGATGCATTTGCTACGCTGCCTTATTTTC : 126
          tGGGGATTACaCTaTaTGTGGAAGGAGaCc GAGATGGAAGATGCatTTGCAaCTGTGCcTcAtTTTC

*      160     *      180     *      200     *
ABI      : TGA AAGTTCCATATCAAATGCTAATGGTGACCGGCTCTTTGATGGTATGAGCAAGTATTA ACTCAACA : 137
Ricinus : TGA A AATTCCTATCAAATGCTAATGGTGACCGGCTGCTTGATGGCGTGGCAAGTATTA ACTCAACA : 210
Populus : TGA A AATTCCTATCAAATGCTGATGGTGACCGGATTA CTGATGGAATGAGCAAGTATTTGCCTCAACA : 196
          TgAAA TTCCATtCAAATGCTaATTGGtGACCgGgT cTTGATGG aTgAGCAAGTATaTaaCTCAACA

*      220     *      240     *      260     *      280
ABI      : AAGCGCTCATTTCCTTGGAGTTATGATGGTCATGGAGGCTCA CAGGTGGCA AATTATTGTCTAACCCT : 207
Ricinus : GAGTGCACATTTCTTGGAGTTATGATGGTCATGGAGGCTCG CAGGTGCTA AATTATTGTCTCAACCCT : 280
Populus : GACTGCTCATTTCCTTGGAGTTATGATGGTCATGGAGGCTCGCAAGGTGGCA AATTATTGTCTAACCCT : 266
          gActGCTcATTTCtTtGgAGTtTatGATGGTCATGGAGGCTcGcAgGTgGCaAATTATTGTcgtAaCCGT

*      300     *      320     *      340     *
ABI      : GTCATTCTGCTTTGATGAGGAAATAGAATTCGTG AAGCTGGCCTGAGTCAATGGAAGTTTGAAGGACA : 277
Ricinus : ATGCATTCTGCTCTGGCTGAGGAGATAGAATTTGTTAAAAATGGCCTGGGCAACGGAAGGGTGGTTAATA : 350
Populus : ATGCATTCACTTTCTCCGAGGAGATAGAATTTGTTGA AATGGCCTGAGTCAATGGAAGTATTAAGGATA : 336
          aTcATTCTGCTtTG ctGAGGAgATAGAATTTGTTaAaaaTGGCCTGaGtGAtGGAAGt TgaagGAtA

*      360     *      380     *      400     *      420
ABI      : GTTGGTA GAGCAGTGGAAAAAACAATTCACCAATGTTTTCTAAGGTA GATGCTGAAGTGGAGGAAA : 347
Ricinus : GTTGGCAGGAGCAGTGGAAAAAGACGTTTCAAAATGTTTTATTAAGGTA GATGCTGAAGTGGAGGAAA : 420
Populus : GTTGGCAGGAGCAGTGGAAAAATGCTTTCACCAATGTTTTCTAAGGTTGATGCTGAAGTGGAGGAAA : 406
          GTTGGcagGAGCAGTGGAAAAA gC TTCACcAATGTTTTcTtAAGGTAgATGCTGAAGTGGAGGAAA

*      440     *      460     *      480     *
ABI      : AGGCCTGCTGAACCAAGTTCCTGAAACGTGGGTTCAACTGCTGTTGTGCCATTATTTTTCATCC : 417
Ricinus : GGAAGGTGCTGAACCAAGTTCCTGAAACGGTGGTTC AACTGCTGTTGTGCCATTATTTTTCATCC : 490
Populus : GCGTGTGCTGGAACCAAGTTCCTGAAACGGTGGTTC AACTGCTGTTGTGCCATTATTTTTCATCC : 476
          gG agTGCTGAACCAAGTTCCTGAAACGTGGTTCaACTGCTGTTGTGCCATTATTTgTTCaTCC

*      500     *      520     *      540     *      560
ABI      : CACATGTAGTAGCAAATTCGGAGACTCAAGAGCTGTTCTATACCGTGGTAAAGAACCATGGCATGCT : 487
Ricinus : CACATAATAGTTGCAAATTCGGAGACTCTGAGCAGTTCTATATCGGGGAAAAGAACCATGGCATCT : 560
Populus : CACATCATAGTAGCAAATTCGGAGACTCAAGAGCTGTTCTATGTCGGGAAAAGAACCATGGCATAT : 546
          CACAT aTAGTAgCAAAtTGTGGAGACTCaGAGCaGTTCTaTatCG GG AAAGAACC ATGGCAtT T

*      580     *      600     *      620     *
ABI      : CTGTGGATCATAAACCAAACCGAGAAGATGAATATGCGAGGATAGAGGCAGCTGGAGGCAAGTATATCA : 557
Ricinus : CAGTGGATCATAAACCAAACCGAGAAGATGAATATGCAAGGATAGAGGCAGCTGGAGGAAAAGTATATCC : 630
Populus : CAGTGGATCATAAACCAAACCGAGAAGATGAGTATGCAAGGATAGAGGCAGCTGGAGGCAAGCTATATCA : 616
          CaGTGGATCATAAACCAAACcAGAGAAGATGAaTATGCaAGGATAGAAgGCAGCTGGAGGcAAgGtTATaCa

*      640     *      660     *      680     *      700
ABI      : ATGGAATGGGCATCGTGTCTTTGGCGTCTTGC AATGTCAAGATCCATTGGTGATAGATATTTGAAACCA : 627
Ricinus : ATGGAATGGGCATCGTGTCTTTGGCGTCTTGC AATGTCAAGGTCATTGGTGATAGATATTTGAAACCA : 700
Populus : GTGGAATGGGCATCGTGTCTTTGGCGTCTTGC AATGTCAAGGTCATTGGTGATAGATATTTGAAACCA : 686
          aTGGAAATGGGCATCGTGTCTTTGGcGtTcTtGCAATGTCAAGgTcTtATTGGTGATAGATATTTGAAACCA

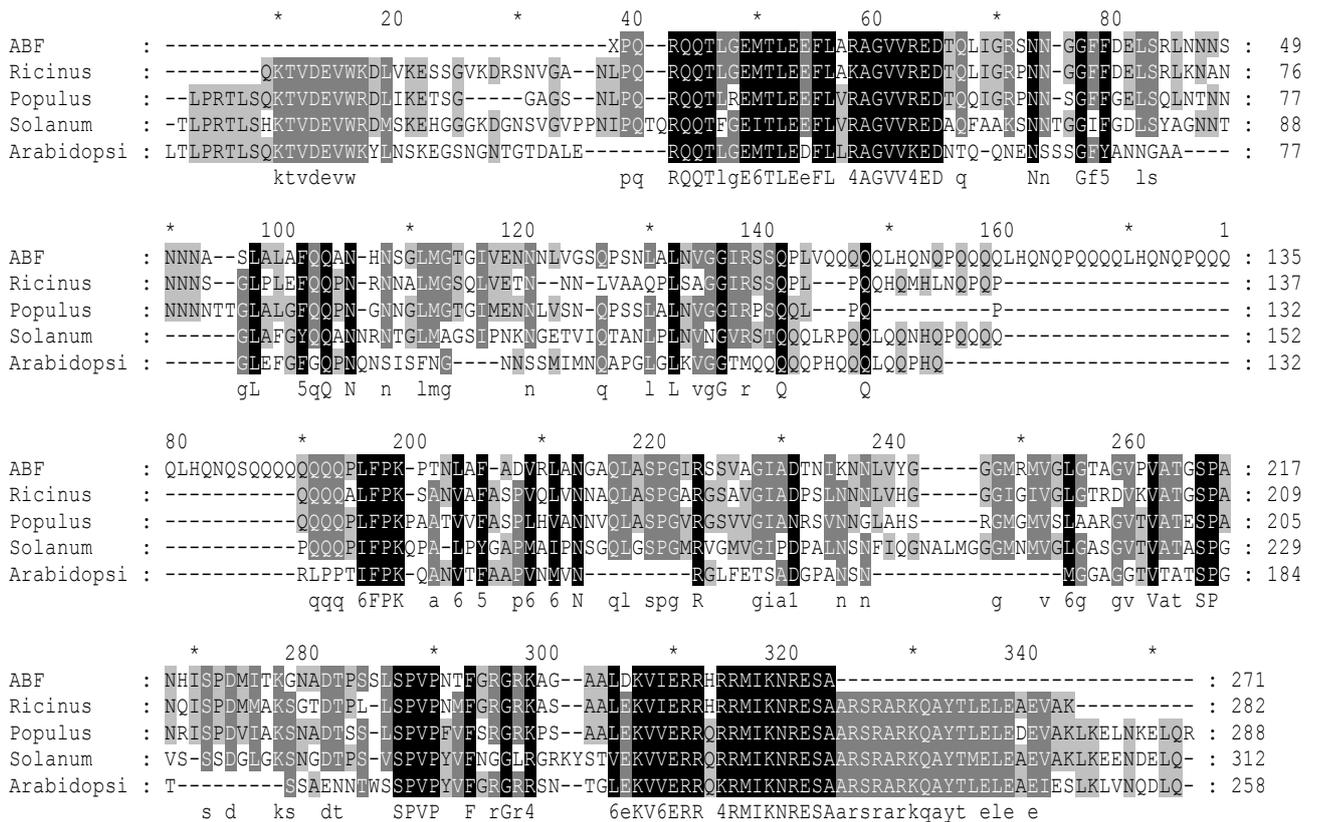
*      720     *      740     *      760     *
ABI      : TGGATAATCCAGAACCAGAAGTGAAATTTATCCCTGGGCGAAAAGAAGATGAATGCTTATCTAGCTA : 697
Ricinus : TGGATCATCCAGAACCAGAAGTGAAATTTATCCCTGGGCAAAAAGAAGATGAATGCTCATCTGGCTA : 770
Populus : TGGATATTCAGAACCAGAAGTGAATTTATCCCTAGGCGAAAAGAAGATGAATGCTCATCTGGCAA : 756
          TGGAT ATTCAGAACCAGAAGTgAtGTTTATtCCTcGgGcAAAAGAAGATGAATGcTcAtTCTgGcTcA

*      780     *      800     *      820     *      840
ABI      : GTGATGGTTATGGGATGTAATGTC AATGAAGA GCATGTGATCTGCTCGGAGACGAATACTTGTGTG : 767
Ricinus : GTGATGGTTATGGGATGTAATGTC AATGAAGA GCATGTGATCTGCTCGGAGACGAATACTTGTGTG : 840
Populus : GTGATGGTTATGGGATGTAATGTC AATGAAGA GCATGTGATCTGCTCGCAACGAATACTTGTGTG : 826
          GTGATGGTtTatGGGATGTcATgTcGAAAGAGcCATGTGATCTgGcTcGgAgACGAATACTTGT TG

*      860     *      880     *      900     *
ABI      : GTACAAAAAGAATGGTTCGCGTTCCCACTCAAGGGCGTGAAGGATGATC -TGCAGCTCAAGCAGCA : 836
Ricinus : GCACAAAAAGAATGGTGTGCACTCCCACTCAAGGGGATGGAATGATC -TGCAGCTCAAGCAGCA : 907
Populus : GCACAAAAAGAATGGTTCGCGCTCTCTCAAGGAGCGAGGGAATT----- : 875
          GcACAAAAAGAATGGT TCGcTtCCac tCAAGGGG GA GGAATTgatc tgcagctcaagcagca

```

Anexo 2. Alinhamento da sequência nucleotídica de ABI, obtida pelos primers degenerados para CBF com sequências homologas. Alinhamento entre a sequência nucleotídica de ABI, obtida pelos primers degenerados para CBF, e entre sequências que obtiveram *hit* na base de dados (Genebank, NCBI). As espécies utilizadas para realizar este alinhamento foram as que obtiveram maior homologia (*Ricinus communis* e *Populus trichocarpa*).



Anexo 3. Alinhamento da sequência proteica de ABF1, obtida pelos primers degenerados para *ABF* com sequências homologas. Alinhamento entre a sequência proteica de ABF1, obtida pelos primers degenerados para *ABF*, e entre sequências que obtiveram *hit* na base de dados (Genebank, NCBI). As espécies utilizadas para realizar este alinhamento foram as que obtiveram maior homologia (*Ricinus communis*, *Populus trichocarpa* e *Solanum lycopersicum*) e uma planta modelo com genoma sequenciado (*Arabidopsis thaliana*).

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *
JcABF1 : -----CCTCaaAGGCAACAGACCTTTAGGAGAAATGACTTTGGAGGAGTTCTGGCCAG : 53
Ricinus : -----GAGCTAATTTTCCCTCAGAGGCAACAGACCTTTAGCTGAGATGACTTTGGAGGAGTTCTGGCCAA : 64
Populus : GATAAAAGAAACCAGTGGTGGTGACAGATCCAAATTTCCACAAAGGCAACAGACCTTTAGGAGATGACTTTGGAGGAGTTCTGGTGAG : 90
          ga c aatttaCCTCaaAGGCAACAGACCTTTAgGaGAgATGACTTTGGAGGAGTTcTTGGccAg

*      100     *      120     *      140     *      160     *      180
JcABF1 : AGCAGGAGTGTAGGAGGAGATACTCAGCTAATGGGAAGTCaAATAATGGTGGATTCTTTGATGAATATCACCAGCTAAAATAATATAG : 143
Ricinus : GGCAGGGGTGTGAGAGGAGATACTCAGCTAATGGGAAGCCAAATAATGGTGGATTCTTTGATGAATATCAGACTAAAATAATGCTAAR : 154
Populus : GGTGGGGTGTGAGAGGAGATACTCAGCTAATGGGAAGCCAAATAATGGTGGATTCTTTGATGAATATCAGACTAAAATAATGCTAAR : 180
          gGcAGGgTgTgAgAGGAGATACTCAGctAAtTGGAAgGcCaAATAATgTGGGATTCTTTGATGAATATCacgAcTAAAtAataatAa

*      200     *      220     *      240     *      260     *
JcABF1 : CAATAAACAATG-----CCAGTTTAGCTCTTGCCTTCAGCAGCCAAATCAGAAATAGTGGGCTTATGGGCCTGGGATAGTTGAAA---A : 224
Ricinus : TAACAATAACA-----GTGGTTTACTCTTGTACTTTAGCAGCAGCCAAATCGAAATATGCGCTAATGGGATCAGACTAGTGGAAACCAAR : 238
Populus : CAACAACAACAACACTACTGGTTTGGCTCTTGCCTTCAGCAGCCAAATCGAAACAAATGGGCTTATGGGCTGGGATAGTTGAGAA---- : 266
          cAAcAaCAca          ctgGTTTAgCTCTTg gTtTcAGCAGcCAAAATcgaAAtAaTgGcTtATGGG aCtggGaTgTgGAAa a

*      280     *      300     *      320     *      340     *      360
JcABF1 : TAATAACTTAGTTGGTGTGAGCAGCCTCTCTAATTTAGCCTTAAATGTAGGCGGGATCAGATCCCTCTCAGCCACTAGTTCAGCAGCAGCAGCA : 314
Ricinus : TAACAACCTTAGTTGGTGTGAGCAGCCTCTCTAATTTAGCCTTAAATGTAGGCGGGATCAGATCCCTCTCAGCCACTAGTTCAGCAGCAGCAGCA : 316
Populus : --CAAACTTAGTTTCTTACAGCAGCCTCTCTAATTTAGCCTTAAATGTAGGCGGGATCAGATCCCTCTCAGCCACTAGTTCAGCAGCAGCAGCA : 337
          taAcAAcCTTAGTTgCTa tCAGCcttcta tttagct TgAaTgTaGGTGGaATCAGATCCCTCTCAaCcACTA tcagcagca cag

*      380     *      400     *      420     *      440     *
JcABF1 : GCTGCATCAGAACCAGCCCCAGCAGCAGCAGCTGCATCAGAACCAGCCCCAGCAGCAGCAGCTGCATCAGAACCAGCCCCAGCAGCAGCA : 404
Ricinus : GC----- : 318
Populus : ----- : -
          gc

*      460     *      480     *      500     *      520     *      540
JcABF1 : GCTGCATCAGAACCAGTCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCTCTCTCTCCCAAAGCCACA---AATTTAGCATTTGCGGGA---TGT : 488
Ricinus : -----ACCTGAACCAGCCCCAGCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCTCTCTCCCAAAGTCTACA---AATGTGGCATTTGCAATCCCTGT : 394
Populus : -----CCGCAGCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCTCTCTTCCCAAAGCCAGCAGCAGCAACTGTGGTGTTCATCAGCAGCTTT : 405
          acc g ccagCcgCAGCc CAGCAGCAGCAGcCtCTTtCCCAAAGcCagCA AaTgTgGcaTTTGCatc ccTgT

*      560     *      580     *      600     *      620     *
JcABF1 : ACCCTTTGCAAAAGGTGGCAGCCTTGTACTCCAGGAATCAGCAGTTCAGTGTGGTATTGCAAGATAAAATATAAGAAATATTTAGT : 578
Ricinus : GCATTTGCAAAATGCTCAGCCTTGTAGCCCAAGGAGCGAGGGTTCAGCTGTGGGATTGCAAGATCCATCTTTAAACAATATTTAGT : 484
Populus : ACATGTTGCAAAACAATGTTTCCAGCCTTGTAGCCCTGGAGTGAAGGATCGGTTGTGGGATTGCAAGATCCATCTTTGAAATATTTAGT : 495
          aCattTaGcaAAtaaTgctCAGCTTGTcAGcCCaGGAGtgAGgggTtCaGtTgTGGgATTGCAgATccAtcT TaAAcAAATaaTtTAGT

*      640     *      660     *      680     *      700     *      720
JcABF1 : TCATGCTGGTGGAAATCAGAAATGGTTGTTTGGAAATGCAGGTGTTCGGTTGGCAACAGGATCTCCTGCAAACCAATATCACCAGATAT : 668
Ricinus : TCATGCTGGTGGAAATGGCAATGGTTGTTTGGAAATGCAGGTGTTCGGTTGGCAACAGGATCTCCTGTAACAGATATCACCAGATAT : 574
Populus : TCACAGTTAGAGGAATGGGAATGGTTTGGAAATGCAGGTGTTCGGTTGGCAACAGGATCTCCTGCAAACCAATATCACCAGATAT : 585
          TCAtgTgGAGAAATgGaaTgGTTgGTTTAgGAAcTagaGgTGTtTacaGtTGCaACAGgATCTCCTGCaaACcagATATCACCAGATAT

*      740     *      760     *      780     *      800     *
JcABF1 : GATCACAAAAAGGTAACCCAGATACGCCTTTTCCACTATCACAGTTCaAAACACTTTTGGACGGGGAAGAAAAGCAAGTGCCTTTGGA : 758
Ricinus : GATGCAAAAAGTGGTAACCCAGATACGCCTTTTCCACTATCACAGTTCaAAACACTTTTGGACGGGGAAGAAAAGCAAGTGCCTTTGGA : 661
Populus : GATGCAAAAAGGTAATCTTGAACATCTTCCACTATCACAGTTCaAAACACTTTTGGACGGGGAAGAAAAGCAAGTGCCTTTGGA : 672
          GAT gCAAAAaAGTaatgCaGAtAcGcCTTc aCTATCACAGTTCtaacataTTTgG CGGGGAAGAAAAGcCAGTGCAGCTtTGGa

*      820     *      840     *      860     *      880
JcABF1 : CAAAGTAATTTGAGAGAAGGCACCGGAGAAATGATCAAAAACCGGAGAAATGCGCA----- : 810
Ricinus : AAAGGTAATTTGAGAGAAGGCACCGGAGAAATGATCAAAAACCGGAGAAATGCGCA----- : 740
Populus : GAAGGTTGTTGAGAGAAGGCAGAGGAGAAATGATCAAAAACCGGAGAAATGCGCA----- : 723
          AAgTAAaTTGAGAGAAGgCAccGGAGaATGATtAAAAAccGAGAgTcaGca

```

Anexo 4. Alinhamento da sequência nucleotídica de *ABF1*, obtida pelos primers degenerados para *ABF* com sequências homólogas. Alinhamento entre a sequência nucleotídica de *ABF1* obtida pelos primers degenerados para *ABF*, e entre sequências que obtiveram *hit* na base de dados (Genebank, NCBI). As espécies utilizadas para realizar este alinhamento foram as que obtiveram maior homologia (*Ricinus communis* e *Populus trichocarpa*).

```

      *          20          *          40          *          60          *          80          *
JcABF2 : -----X-TLSQKTVDEVVKDISKEYVNG--CGTGGGVANVP--Q--RQQTIGEMTLEEFVRA : 51
Ricinus : ---EETHNMVASCSTGQGEGL--LQRQGSLLPRTLSTKTVDEVVKDISKEYGNG--NANGGVVTLNLP--Q--RQQTIGEMTLEEFVRA : 79
Populus : ---ETQTVATATSAGVQDGVG---LQRQGSLLPRTLSTKTVDEVVKDMSKEYAIN--GTSAGVANNVP--Q--RQQTIGEMTLEEFVRA : 79
Solanum : NAEENQTIIGPGINGQIVGVPRGH--LQRQGSLLPRTLSTKTVDEVVWRDMSKEYHGGGKDKNSVGVPPNIP--Q--RQQTIGEMTLEEFVRA : 89
Arabidopsi : -----GVVPVLGGQEGIQ---LQRQGSLLPRTLSTKTVQVVKDLSKVGSSGVGGSNLSQVAQAQSQS--SQRQQTIGEMTLEEFVRA : 82
      g          lqrqgsllprTLS KTVQVVKDLSKVGSSGVGGSNLSQVAQAQSQS SQRQQTIGEMTLEEFVRA

      100          *          120          *          140          *          160          *          180
JcABF2 : : GVVREDAQLAGKLNANGGFYGDLSRSGNNSGFLGFQONRVLA--SNNTNQISMHSSNLPLNVNGVRSNQAQVQQQQQQ--QQQ : 134
Ricinus : : GVVREDAQLAAKLVNTNGGFDFSRSGNNSALGIGFQONRVLGLNI--NNGNNSNNTNQISLQSSNLPLNVNGVRSNOANIQQQQQQQRQQQ : 170
Populus : : GVVREDIPVAAKLVNTNGGFDFDLRLANNSS--AIGFQONRVGLN--NNNTNQISLQSSNLPLNVNGVRSNQAQVQQQQQQ-- : 158
Solanum : : GVVREDAQFAAKSNNTGGIFGDLRYAGNNTGLAFGYQQANNRNTGL--MAGSIPNKNGETV--LQTANLPLNVNGVRSNQAQVQQQQQQNHQP : 179
Arabidopsi : : GVVREDAQVAARAQIAENNKGGYFGNDANTGFSVEFQQPSPRVVAAGVMGNLGAETA--SLQVQGSNPLNVNGARTYQQSQQQQP----- : 168
      GVVREdaq Aa4 n gg Gd nN g5QQ n n 6 6q snLPLNVNG R3 q q qqQQ qq

      *          200          *          220          *          240          *          260          *
JcABF2 : : QQQ-----IFPKOPTLGYVTQMPLQTS-----PGIRSG--IMGIGDQALGGGLMQG-----GGLGMVGLGG---VATGSPANQLSSDGITK : 205
Ricinus : : QQQ-----IFPKQPNLGYVTQVPLQNS-----PGIRGG--IMGIGDQALGGGLMQG-----GGMGVGLGG---VATGSPANQLSSDGITK : 241
Populus : : --Q-----IFPKQPNMGYVTQMPQQSS-----PGIRGG--ILGIGDQALGGGLMQG-----GGMGVGLGG---VATGSPANQLSSDGITK : 226
Solanum : : QQQQQQQPPIFPKQPAIPYGAIPATIPNSGQLGSPGMRVG--MVGIPDPALNSNFIQGNALMGGMNVMVGLGASGVTVATASPGVS--SSDGLGK : 269
Arabidopsi : : -----IMPKQPGFGYGTQMGQLNS-----PGIRGGGLVGLGDQSLTNNVGFVQGASAAIPGALGVG-----AVSPVTPISSEGIGK : 239
      q          IfPKQP gY tq6 S PG6R G 66G6gDq 6 qq gg g 6G6G vat SP lSSdG6 K

      280          *          300          *          320          *          340
JcABF2 : : SNGDTSVSPVPYVFNGLRGRRTGAVEKVVERRQRRMIKNRES----- : 250
Ricinus : : SNGDTSVSPVPYVFNGLRGRRAGGAVEKVVERRQRRMIKNRESAARSARKQAYTMELEAEVAKLKEE : 311
Populus : : SNGDTSVSPVPYVFNGLRGRRAGGAVEKVVERRQRRMIKNRESAARSARKQ----- : 280
Solanum : : SNGDTSVSPVPYVFNGLRGRKYS--TVEKVVERRQRRMIKNRESAARSARKQAYTMELEAEVAK---- : 334
Arabidopsi : : SNGDSSLSFSPYMFNGGVRGRK--SGTVEKVVERRQRRMIKNRESAARSARKQVNLFITIYLCT----- : 303
      SNGD3sS6SPvPY6FnGg RGR4 g VEKVVERRQRRMIKNRESaarsrarkq

```

Anexo 5. Alinhamento da sequência proteica de ABF2, obtida pelos primers degenerados para ABF com sequências homologas. Alinhamento entre a sequência proteica de ABF2, obtida pelos primers degenerados para ABF, e entre sequências que obtiveram *hit* na base de dados (Genebank, NCBI). As espécies utilizadas para realizar este alinhamento foram as que obtiveram maior homologia (*Ricinus communis*, *Populus trichocarpa* e *Solanum lycopersicum*) e uma planta modelo com genoma sequenciado (*Arabidopsis thaliana*).

```

JcABF2 : -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80 : 28
Ricinus : -----ATTCAGAGGGCAGGGGTTTAAACCTGCCACAAACATAGAGCCAGAAGACGGTTGACGAGG : 62
Populus : -GGTACAGATGGTGTGGTCCAGAGCCAGGGCTCGCTGAGCTGCCGCCAGACATGAGCCTGAAGACGTGGATGAGG : 80
Arabidopsi : TCCCACCCCGGTTGGGAATCCAGAGCCAGAGTTCGTTGAGGTTCGCCTAACAACATAGTCAAGACTGTTCAAGAGG : 81
t c a g g c a g g t c t a c t g c c g A c a T A g c A g A A G A C G T G a t G a g g

JcABF2 : -----*-----100-----*-----120-----*-----140-----*-----160 : 100
Ricinus : -----TTCGAAAGACATATCAAAAGGATATCGGAAATGGAAATCCAAAT-----GAGGCCATGATAAGAAATTTACCACA---GA : 134
Populus : -----TTCGAAAGACATATCAAAAGGATATCGTATTAATGGACTAGT-----CTGGACTGCTAATAATTTGCCCA---AA : 152
Arabidopsi : -----TTCGAAATGTTTATGATCCCAAGGATGTAATATGGAAGGATGACAGCGGAAGCCGTTGTTAGTGAATTTGCCCTCTGGAA : 162
TgTGGAAAgacaT tcaAaggA tAtG AaT g g A t Gg GG G G c AATgTgCCcCa A

JcABF2 : -----*-----180-----*-----200-----*-----220-----*-----240 : 180
Ricinus : -----GGCAGCAGACITTTGGGAGAGATGACTTAGAGGAGTTTITGTTGAGAGCTGGGTTGTTAAGCAAGATGCTCAATAGCT- : 214
Populus : -----GGCAGCCTACTTAGGAGAGATTAATTTGGAGGAGTTTITGTTGAGAGCTGGGTTGTTAAGCAAGATGCTCAATAGCT- : 232
Arabidopsi : -----GGCAACAGACITTTAGGAGAAATGACACTTGAAGAAATTTGTTCCGTTCCGTTGGGTTGTTAAGCAAGATGCTCAATAGCT- : 243
GGCAGcAgAcTtTt GG GA ATgAc T GAgGA TTTtTgTgTgaGagCTGgGtTt AGaGaAagAT tc a T gct

JcABF2 : -----*-----260-----*-----280-----*-----300-----*-----320 : 250
Ricinus : -----GCCAAGCTTAATACTAATGGTGGTTTCTTTGGTGAATTTCTCAAGGTCAGGGAATAATGCTTCTTAGGAA : 284
Populus : -----GCCAAGCTTAATACTAATGGTGGTTTCTTTGGTGAATTTCTCAAGGTCAGGGAATAATGCTTCTTAGGAA : 299
Arabidopsi : -----AGATGGGTCAGTCCAAAGCAACAGCAATAACAAATGGGTTTATGCTAACAGCACTGCTGCTGCCGC---TAGCTTTT : 321
G AA gttAAataCTAatgTGG TTTt TGGTgAt t c gg caGggaataat gTtt GgA

JcABF2 : -----*-----340-----*-----360-----*-----380-----*-----400 : 310
Ricinus : -----TTGGGTTTCAGCAGAAATAGGCTTTCTGCATTAACAGTAATAAT-----ACTAATCAGATTTCTA : 365
Populus : -----TTGGGTTTCAGCAGAAATAGGCTTTCTGCATTAACAGTAATAAT-----ACTAATCAGATTTCTA : 359
Arabidopsi : -----TTGGTTCAGCAGAAATCAACACAGCAATAACAAATGGGTTTATGCTAACAGCACTGCTGCTGCCGC---TAGCTTTT : 381
TTGGGttttCagcA aAtAg g t Tgg aTT Aata tAaTAAT ac aaTcagAT Tc

JcABF2 : -----*-----420-----*-----440-----*-----460-----*-----480 : 391
Ricinus : -----TCGATTCCTCGAATTTACCTTTGCAACGTTAAATGGGGTCAGATCAAAATCAGGCAACAGTACAGCAGCAGCAGCAGC : 446
Populus : -----TCGATTCCTCGAATTTACCTTTGCAACGTTAAATGGGGTCAGATCAAAATCAGGCAACAGTACAGCAGCAGCAGCAGC : 435
Arabidopsi : -----ATCAGCCACCTGGTTTGGGGCTCAAAATGGGGTCAACATGACAGCAACACAAACAGCAGTTCGTTACAGCAGCAGC : 462
tgCA tC tCgaATTT cc tTgAA gttaatGGg t AgatcaaATCAGgcAca taCAGcAGcAGcAGcA CAgca c

JcABF2 : -----*-----500-----*-----520-----*-----540-----*-----560 : 469
Ricinus : -----GAGAAACAGCAGCAGCAGCAAAATATTCCTAAGCAGCCTACTTTGGGATATGTTGACACAGATGCTCTGTCAGAC : 527
Populus : -----GAGAAACAGCAGCAGCAGCAAAATATTCCTAAGCAGCCTACTTTGGGATATGTTGACACAGATGCTCTGTCAGAC : 497
Arabidopsi : -----AAGAGCAGATCAGCAGCAGTGAATCAGCTCAACAGCAGCAGGCTGCCCTCAAAACATTTTTCCTAAACAAAGACG : 543
a ca g c a g c a g c a A t a t t C c t a A g C a g C t a a t t G g g a t A t g t A c a c a g T g C C T C A a a T a g t c c t g

JcABF2 : -----*-----580-----*-----600-----*-----620-----*-----640 : 549
Ricinus : -----GAATTAGGAGTGGAAATCATGGCAATGGAGATGAGGCCTTTGGTGGTGGTTTGGATGAGGGTGG-AGCTTTTGGAAATGGTT : 607
Populus : -----GAATTAGGAGTGGAAATCATGGCAATGGAGATGAGGCCTTTGGTGGTGGTTTGGATGAGGGTGG-AGCGATGGAAATGGTT : 577
Arabidopsi : -----GAATTTTC---TGGCCCTGTGAATATAACCAACAAGGTTTTCGTTGGCTGCAAAATAATTCTATCAACAATAATAGGAT : 621
gAaTTag gTggaat TGgg ATtgg gAtcAgGgg Tt TgG g T tgAtgcAgggTgg Agg aTgggAaTggtT

JcABF2 : -----*-----660-----*-----680-----*-----700-----*-----720 : 630
Ricinus : -----GGATTAGGAGGTTGGGACAGGATCACCTGCAAAACACCTATCCCTCGGATGGGATCACAAAGAGCAAGGGTGATATTTCT : 688
Populus : -----GGATTAGGAGGTTGGGACAGGATCACCTGCAAAACACCTATCCCTCGGATGGGATCACAAAGAGCAATGGTGATACATCT : 655
Arabidopsi : -----TAGCTAGTTACGAGGACCGGGTCAGTGTTCAGCAACTTCTCAGGGA-----ACAGCAAGCAGCAAAATTAAT : 692
ggattTAGg tgt Gc aCagG TCACctgC aAccAgct tcctc Gatgg at AagAG Aa Gg GatAc tct

JcABF2 : -----*-----740-----*-----760-----*-----780-----*-----800 : 711
Ricinus : -----TCAGTATCACCAAGTTCCTTATGCTATTAATGAGGTTTGAGAGGGGAGGAGAGCTGGTGGTGGCTGGGAGAAGGTTGGT : 769
Populus : -----TCAGTATTCACCAAGTTCCTTATGCTATTAATGAGGTTTGAGAGGGGAGGAGAGCTGGTGGTGGCTGGGAGAAGGTTGGT : 736
Arabidopsi : -----TCATTTATCACCAAGTTCCTTATGCTATTAATGAGGTTTGAGAGGGGAGGAGAGCTGGTGGTGGCTGGGAGAAGGTTGGT : 764
TCagTATcACcAGTtCC TATGT tTTAATgGAgGt aaGagG Ag AgAGc tgg gctgT GAGAAGGTTggTtGAg

JcABF2 : -----*-----820-----*-----840-----*-----860-----*-----880 : 749
Ricinus : -----AGGAGGCAGAGAAAGAAATGATCAAAACCAGAGATTCGCTGCTGCAAGATCACGGCTCGCAAGCAGGCTTAT----- : 838
Populus : -----AGGAGGCAGAGAAAGAAATGATCAAGAAAGAGAGTCAAGCTGCAAGGTTGCTGCTCGCAAGCAGGCTTATACGATGGAATTG : 817
Arabidopsi : -----AGGAGGCAGAGAAAGAAATGATCAAGAAAGAGAGTCAAGCTGCAAGGTTGCTGCTCGCAAGCAGGCTTATACATG----- : 839
AGGAGGCAGAG AAAGAAATGATcAAgAaccG GA TC Gctgc ag tc g gctcg aagcaggcttat

```

Anexo 6. Alinhamento da sequência nucleotídica de *ABF2*, obtida pelos primers degenerados para *ABF* com sequências homologas. Alinhamento entre a sequência nucleotídica de *ABF2* obtida pelos primers degenerados para *ABF*, e entre sequências que obtiveram *hit* na base de dados (Genebank, NCBI). As espécies utilizadas para realizar este alinhamento foram as que obtiveram maior homologia (*Ricinus communis* e *Populus trichocarpa*) e uma planta modelo com genoma sequenciado (*Arabidopsis thaliana*).

```

*      20      *      40      *      60      *      80
Ricinus : FLDEEIVHQYYNGYCNNILWPLFHYLGLPQEDRLATTRSFQSQFAAYKKANQMFADVVNKHYYEEDVVWCHDYHLMFLPKCLK : 83
Populus : FLDEEIVHQYYNGYCNNILWPLFHYLGLPQEDRLATTRSFQSQFAAYKKANQMFADVVNQHYYEEDVVWCHDYHLMFLPKCLK : 83
Solanum : FLDEEIVHQYYNGYCNNILWPLFHYLGLPQEDRLATTRSFQSQFAAYKKANQMFADVVNEHYEEDVVWCHDYHLMFLPKCLK : 83
Arabidopsi : FLDEEIVHQYYNGYCNNILWPLFHYLGLPQEDRLATTRSFQSQFAAYKKANQMFADVVNEHYEEDVVWCHDYHLMFLPKCLK : 83
Jcurcas : -----XHQYYNGYCNNILWPLFHYLGLPQEDRLATTRSFQSQFDAYKKANQMFADVVNEHYEEDVVWCHDYHLMFLPKCLK : 77
          fldeeivHQYYNGYCNNILWPLFHYLGLPQEDRLATTRSFQSQFaAYKKANQMFADVVN HYEEDVVWCHDYHLM5LPKCLK

*      100     *      120     *      140     *      160
Ricinus : EYNSNMKVGWFLHTPPFSSEIHRTLPSRSELLHSLVAADLVGFHTYDYARHFVSACTRILGLEGTPEGVEDQGRLTRVAAFPI : 166
Populus : EYNNNMKVGWFLHTPPFSSEIHRTLPSRSELLRSVLAADLVGFHTYDYARHFVSACTRILGLEGTPEGVEDQGRLTRVAAFPI : 166
Solanum : DYNSSMKVGWFLHTPPFSSEIHRTLPSRSELLRAVLAADLVGFHTYDYARHFVSACTRILGLEGTPEGVEDQGRLTRVAAFPI : 166
Arabidopsi : EYNSNMKVGWFLHTPPFSSEIHRTLPSRSELLRSVLAADLVGFHTYDYARHFVSACTRILGLEGTPEGVEDQGRLTRVAAFPI : 166
Jcurcas : EYNGNMKVGWFLHTPPFSSEIHRTLPSRSELLRSVLAADLVGFHTYDYARHFVSACTRILGLEGTPEGVEDQGRLTRVAAFPI : 160
          eYN MKVGWFLHTPPFSSEIHRTLPSRSeLLRsVLAADLVGFHTYDYARHFVSACTRILGLEGTPEGVEDQGRLTRVAAFPI

*      180     *      200     *      220     *
Ricinus : GIDSERFIRALEVPQVQEHIKELKERFAGRKVMLGVDRLDMIKGIPQKILAFEKFLEENSHWRD : 230
Populus : GIDSDRFIRALELPQVQEHIKELKERFAGRKVMLGVDRLDMIKGIPQKILAFEKFLEENSAW-- : 228
Solanum : GIDSERFIRALEVTQVQEHIKELKERFAGRKVMLGVDRLDMIKGIPQKILAFEKFLEENPYW-- : 228
Arabidopsi : GIDSDRFIRALEVPEVKQHMKELKERFTDRKVMLGVDRLDMIKGIPQKILAFEKFLEENANWRD : 230
Jcurcas : GIDSERFIRALELPQVQDHIKELKERFSGRKVMLGVDRLDMIKGIPQKILAFEKFLE----- : 217
          GIDS RFIRALE6p2Vq H6KELKERF gRKVMLGVDRLDMIKGIPQKILAFEKFLEen w

```

Anexo 7. Alinhamento da sequência proteica de T6PS, obtida pelos primers degenerados para T6PS com sequências homólogas. Alinhamento entre a sequência proteica de T6PS, obtida pelos primers degenerados para T6PS, e entre sequências que obtiveram *hit* na base de dados (Genebank, NCBI). As espécies utilizadas para realizar este alinhamento foram as que obtiveram maior homologia (*Ricinus communis*, *Populus trichocarpa* e *Solanum lycopersicum*) e uma planta modelo com genoma sequenciado (*Arabidopsis thaliana*).

```

*          20          *          40          *          60          *          80          :  -
Jcurcas   : -----TTCTAGGTGTGAAAGGATTTTGAGGCAAGATGGATTGGCTGGGGCTGGGTAAGTGTGCCAGATGAG : 65
Ricinus   : -----TTCTAGGTGTGAAAGGATTTTGAGGCGAATGGATTGGCTGGGGCTGGAGTAAATGTGCCAGATGAA : 52
Populus   : -----GTGCTCTTCTTGGTGTGAAAGGATTTTGAGGCTAGATGGATTGGCTGGGGAGGCTGGAATGTGCCAGATGAG : 71
Solanum   : -----GTGCTCTTCTTGGTGTGAAAGGATTTTGAGGCTAGATGGATTGGCTGGGGAGGCTGGAATGTGCCAGATGAG : 82
Nicotiana : AGGTCTAGTTAGTGTCTTCTTGGTGTGAAAGGATTTTGAGGCTAGATGGATTGGCTGGGGAGGCTGGAATGTGCCAGATGAG
          gga tttgaggc a atggattgg tgggc gg gt aa gtgccagatga

*          100         *          120         *          140         *          160         :  7
Jcurcas   : -----CATCACT : 7
Ricinus   : ATTTGGCCAGAAAGGCACTTACTAAAGCTTTGGCTGAAAAAGGGTGCCATACCAAGTATTTCTTGATGAAGAGATTGTCCATCAAT : 147
Populus   : GTTTGGCCAGAAAGGCGCTTACTGAAAGCTTTGGCTGAAAAAGGGTGATTCGGGTATTCCTTGACGAAGAGATTGTTCATCAAT : 134
Solanum   : GCTGGCCAGAGGGCACTTACTAAAGCACATGGCAAAAAAGGGTGATCCCTGTATTCCTTGATGAAGAAATTGTTTCATCAAT : 153
Nicotiana : GCGGGCCAGAGGGCACTTACTAAAGCACATGGCAAAAAAGGGTGATCCCTGTATTCCTTGATGAAGAAATTGTTTCATCAAT : 164
          gg caga ggc cttact a gc tggc gaaaa aggtg at cc gt tt ct ga gaaga attgt CATCA T

*          180         *          200         *          220         *          240         :  89
Jcurcas   : ATTAATAAGGGTATTTGTAACAACATATTTGGCCCTCTTTTTCATTATCTTGGACTTCCAACAAGAAGATCGCTGGCCACACAC : 89
Ricinus   : ATTAATAAGGGCTAGTGAACAACATCTTTTGGCCCTCTTTTTCATTACCTTGGACTTCCGCAAGAAGATCGCTTGGCCACCAC : 229
Populus   : ATTAATAAGGGCTACTGCAACAATATATTTGGCCCTCTTTTTCATTACCTTGGACTTCCCAAGAAGATCGACTTGGCCAGAC : 216
Solanum   : ATTAACAAGGTTAGTGAACAACATATTTGGCCCTCTTTTTCATTATCTTGGACTTCCGCAAGAAGATCGCTTGGCCAGCTAC : 235
Nicotiana : ATTAACAAGGTTAGTGAACAACATATTTGGCCCTCTTTTTCATTATCTTGGACTTCCGCAAGAAGATCGCTTGGCCAGCTAC : 246
          ATTA AA GG TA TGcAACAA ATaTtTgTGGcCTCTtTtCATTA CTTGGaCTTCC CAAGAAGA CgCt GC AC AC

*          260         *          280         *          300         *          320         :  171
Jcurcas   : CAGAAGTTCCAGTCTCAGTTTGCATGCATATAAGAAAGGCTAAICAAATGTTTGCATGATGTTGCAATGAGCACTAAGAAG : 171
Ricinus   : TAGAAGCTTCCAGTCTCAGTTTGCATGCATATAAGAAAGGCTAAICAAATGTTTGCATGATGTTGCAATGAGCACTAAGAAG : 311
Populus   : CAGAAGTTCCAGTCTCAGTTTGCATGCATATAAGAAAGGCTAAICAAATGTTTGCATGATGTTGCAATGAGCACTAAGAAG : 298
Solanum   : CAGAAGTTCCAGTCTCAGTTTGCATGCATATAAGAAAGGCTAAICAAATGTTTGCATGATGTTGCAATGAGCACTAAGAAG : 317
Nicotiana : CAGAAGTTCCAGTCTCAGTTTGCATGCATATAAGAAAGGCTAAICAAATGTTTGCATGATGTTGCAATGAGCACTAAGAAG : 328
          CAGAAGtTCCAGTCTCAGTTTgCTGC TATAgAA GC AATCAAATGTTTgCTGATGT GtGAA A CA TATGAaGA

*          340         *          360         *          380         *          400         *          :  253
Jcurcas   : GGTGATGTTGTTGGTGCATGATATCATCTCATGTTCCCTCCAAAATGCCATAAAGAAATACAAAGGTAACATGAAAGTGC : 253
Ricinus   : GGTGATGTTGTTGGTGCATGATATCATCTCATGTTCCCTCCAAAATGCCATAAAGAAATACAAAGGTAACATGAAAGTGC : 393
Populus   : GGTGATGTTGTTGGTGCATGATATCATCTCATGTTCCCTCCAAAATGCCATAAAGAAATACAAAGGTAACATGAAAGTGC : 380
Solanum   : GGTGATGTTGTTGGTGCATGATATCATCTCATGTTCCCTCCAAAATGCCATAAAGAAATACAAAGGTAACATGAAAGTGC : 399
Nicotiana : GGTGATGTTGTTGGTGCATGATATCATCTCATGTTCCCTCCAAAATGCCATAAAGGTAACAAAGGTAACAAAGGTAACAAAGTGC : 410
          GGTGATGT GT TGGTG CATGA TAcCATcT ATGtTcCT CcAAAATG cT AA GA TACAA ag A ATGAAAGT G

*          420         *          440         *          460         *          480         *          :  335
Jcurcas   : GTTGGTTTTCTCACACTCCCTTTCTTCTTGAATCCATAGGACACTCCCATCTCGATCTGACCTACTGCCTTCAGTCTCT : 335
Ricinus   : GTTGGTTTTCTCACACTCCCTTTCTTCTTGAATCCATAGGACACTCCCATCTCGATCTGACCTACTGCCTTCAGTCTCT : 475
Populus   : GTTGGTTTTCTCACACTCCCTTTCTTCTTGAATCCATAGGACACTCCCATCTCGATCTGACCTACTGCCTTCAGTCTCT : 462
Solanum   : GTTGGTTTTCTCACACTCCCTTTCTTCTTGAATCCATAGGACACTCCCATCTAGATCAGACTGCTCCGAGCAGTCTCT : 481
Nicotiana : GTTGGTTTTCTCACACTCCCTTTCTTCTTGAATCCATAGGACACTCCCATCTAGATCAGACTGCTCCGAGCAGTCTCT : 492
          GtTGGTTTTCT CACAcCCCTTTCC TC TC GAAATcCA AGGACacTgCCaTCT GATC GAgCT CT Cg CaGtTcT

*          500         *          520         *          540         *          560         *          :  417
Jcurcas   : AGCTGCCGATTTAGTTGGTTTTCATACCTATGACTATGCAAGGCATTTTGTAGTGTGTTGACTCGTATCTTGGACTGGA : 417
Ricinus   : TGTGCTGATTTAGTTGGATTTCATACCTATGACTATGCAAGGCATTTTGTAGTGTGTTGACTCGTATCTTGGACTTGA : 557
Populus   : TGAAGCCGATTTAGTTGGTTTTCATACCTATGACTATGCAAGGCATTTTGTAGTGTGTTGACTCGTATCTTGGCTAG : 544
Solanum   : TGTGCTGATTTAGTTGGTTTTCATACCTATGACTATGCAAGGCATTTTGTAGTGTGTTGACTCGTATCTTGGACTTGA : 563
Nicotiana : CAGGCTGATTTAGTTGGTTTTCATACCTATGACTATGCAAGGCATTTTGTAGTGTGTTGACTCGTATCTTGGACTTGA : 574
          GC GC GATTT GTTGG TTTCAcACCTATGACTATGCAAGGCATTTTGTAGTGC TGTACTCGTAT CTTGGACT GA

*          580         *          600         *          620         *          640         *          :  499
Jcurcas   : GGCACACCTGAAGGAGTTGAGGATCAAGGGAGGCTGACTAGAGTTGCAAGTTTCTTCCATTGGTATAGACTCTGACGCTTTA : 499
Ricinus   : GGCACACCTGAAGGAGTTGAGGATCAAGGGAGGCTGACTAGAGTTGCAAGTTTCTTCCATTGGGATAGACTCTGACGCTTTA : 639
Populus   : GGCACACCTGAAGGAGTTGAGGATCAAGGGAGGCTGACTAGAGTTGCAAGTTTCTTCCATTGGGATAGACTCAGATCGGTTA : 626
Solanum   : GGCACACCTGAAGGAGTTGAGGATCAAGGTAGACTGACCAGGCTGCTGCTTCTTCCATTGGTATAGATTGAGACGATT : 645
Nicotiana : GGCACCTCGAAGGAGTTGAGGATCAAGGTAGACTGACCAGGCTGCTGCTTCTTCCATTGGTATAGATTGAGACGATT : 656
          GG AC CcTGAAGGAGT GA GATCAAGG AG CTGAC cG GtTcTcGc TT CC ATTGG ATAGA TC GA CG TT A

*          660         *          680         *          700         *          720         *          7 :  581
Jcurcas   : TAAGAGCACTAGAGCTCCCTCAAGTCCAGGATCATATCAAGAAATTTGAAAGAAAGATTTCTGGCGAAAAGGTAATGTTAGG : 581
Ricinus   : TAAGAGCACTAGAGGTCCTCAAGTCCAGGACACATCAAGAAATTTGAAAGAAAGATTTCTGGCGAAAAGGTAATGTTAGG : 721
Populus   : TAAGAGCTCTTGAAGCTCCCTCAAGTCCAGGAAACATCAAGAAATTTGAAAGAAAGATTTCTGGCGAAAAGGTAATGCTAGG : 708
Solanum   : TTCGAGCCTTGAAGTTAATCAAGTTCAGGAACACATCAAGAAATTTGAAAGAAAGATTTCTGGCGAAAAGGTAATGCTAGG : 727
Nicotiana : TTCGAGCACTTGAAGTTAATCAAGTTCAGGAACATATTAAGAAATTTGAAAGAAAGATTTCTGGCGAAAAGGTAATGCTAGG : 738
          T GAGCAcT GA T cCtCAAGT CAGGA CA AT AAAGAaCT AAAGA AGATTTgCTGG GAAAGGT ATG TAGG

*          760         *          780         *          800         :  648
Jcurcas   : TGTGATCGCCTTGATATGATTAAGGGAATTTCCACAAAAGATACCTTGCTTTCGAAAAATTCCTCGAA : 648
Ricinus   : TGTGATCGCCTTGATATGATTAAGGGAATTTCCACAGAAGATACCTTGCTTTCGAAAAATTCCTCGAA : 771
Populus   : TGTGATCGCCTTGATATGATTAAGGGAATTTCCACAGAAGATTTGCTTTCGAAAAATTCCTCGAA : 763
Solanum   : AGTTGATCGCCTTGATATGATTAAGGGAATTTCCACAGAAGATTTGCTTTCGAAAAATTCCTCGAA : 755
Nicotiana : AGTTGATCGCCTTGATATGATTAAGGGAATTTCCACAGAAGATTTGCTTTCGAAAAATTCCTCGAA : 766
          GTTGAcTcGcCTTGATATGATTA GGA

```

Anexo 8. Alinhamento da sequência nucleotídica de *ABF2*, obtida pelos primers degenerados para *ABF* com sequências homologas. Alinhamento entre a sequência nucleotídica de *ABF2* obtida pelos primers degenerados para *ABF*, e entre sequências que obtiveram *hit* na base de dados (Genebank, NCBI). As espécies utilizadas para realizar este alinhamento foram as que obtiveram maior homologia (*Ricinus communis* e *Populus trichocarpa*) e uma planta modelo com genoma sequenciado (*Arabidopsis thaliana*).