



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

NARA LÍDIA MENDES ALENCAR

MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS ENDOSPÉRMICAS DE PINHÃO-MANSO
DURANTE A GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA PLÂNTULA SOB
CONDIÇÕES DE ESTRESSE SALINO

FORTALEZA

2014

NARA LÍDIA MENDES ALENCAR

**MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS ENDOSPÉRMICAS DE PINHÃO-MANSO
DURANTE A GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA PLÂNTULA SOB
CONDIÇÕES DE ESTRESSE SALINO**

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica. Área de concentração Bioquímica Vegetal.

Orientador: *Prof. Dr. Enéas Gomes Filho*

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- A354m Alencar, Nara Lúcia Mendes.
Mobilização de reservas endospermicas de pinhão-manso durante a germinação e desenvolvimento da plântula sob condições de estresse salino. / Nara Lúcia Mendes Alencar. – 2014.
112 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Bioquímica vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho.
1. Ácidos graxos. 2. Pinhão-manso. 3. Salinidade. 4. Proteínas. 5. Lipídios. I. Título.

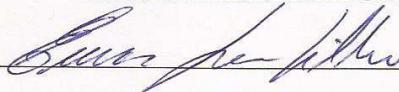
CDD 574.192

NARA LÍDIA MENDES ALENCAR

**MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS ENDOSPÉRMICAS DE PINHÃO-MANSO
DURANTE A GERMINAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA PLÂNTULA SOB
CONDIÇÕES DE ESTRESSE SALINO**

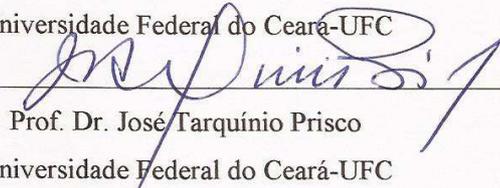
Aprovada em: 19/02/2014

BANCA EXAMINADORA

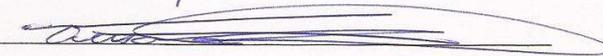


Prof. Dr. Enéas Gomes Filho (Orientador)

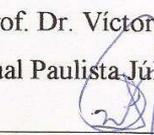
Universidade Federal do Ceará-UFC


Prof. Dr. José Tarquínio Prisco

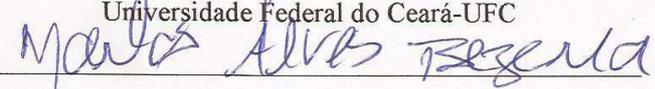
Universidade Federal do Ceará-UFC


Prof. Dr. Victor José Mendes Cardoso

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP Rio Claro


Prof. Dra. Maria Izabel Gallão

Universidade Federal do Ceará-UFC


Dr. Marlos Alves Bezerra

Embrapa Agroindústria Tropical

FORTALEZA

2014

A DEUS

Aos meus pais Francisco Antônio de Alencar e
Maria Evoneide Mendes Sousa Alencar
e ao meu marido Allisson dos Santos Cordeiro

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro;

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade, pelo apoio financeiro concedido a realização desse trabalho;

À Universidade Federal do Ceará, por ter possibilitado a minha formação acadêmica desde a graduação até o doutorado;

Ao professor Enéas Gomes Filho, pela excelente orientação nesse trabalho e durante a minha vida acadêmica até o momento, por ser um exemplo de profissional e de professor, além de ser uma pessoa delicada e humana em relação aos seus orientandos e alunos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, representado pelos seus professores, pela valorosa formação adquirida durante a realização do curso e, pelo apoio e incentivo ao meu crescimento acadêmico e profissional;

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Crateús, especialmente à Diretora Paula Cristina Soares Beserra e ao Chefe de Departamento de Ensino João Henrique Silva Luciano, aos quais agradeço pelo apoio e compreensão aos momentos que precisei me dedicar à conclusão desse trabalho;

Aos professores participantes da banca avaliadora Dr. José Tarquínio Prisco, Dr. Víctor José Mendes Cardoso e Dr. Marlos Alves Bezerra, pelo tempo dedicado a esse trabalho, pelas valorosas colaborações e sugestões que possibilitaram o seu enriquecimento;

À professora Maria Izabel Gallão, pela participação na banca, pelo apoio e incentivo durante toda a realização dos experimentos, principalmente das análises de microscopia;

À professora Mary Anne Heide Dolder, pela ajuda na preparação do material e análises de microscopia eletrônica, pela sua disponibilidade e atenção dispendida na realização das análises da Universidade Estadual de Campinas;

Ao professor José Hélio Costa, pelo auxílio e orientação nas análises de biologia molecular, e a sua orientanda Kátia Saraiva, que contribuíram diretamente para a realização das análises de Biologia Molecular;

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Bioquímica, que participaram da minha formação acadêmica, seja como colegas de disciplinas ou auxílio em alguma atividade experimental;

À Cibelle Gomes Gadelha, pelo auxílio nas atividades experimentais durante todo o período de doutorado, pelo apoio e carinho constantes;

Aos meus amigos Elton Camelo Marques e Rafael de Souza Miranda, por terem contribuído para a realização desse trabalho, pelo auxílio e esclarecimentos em diversas análises experimentais, pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis;

Às minhas amigas Alexcyane Rodrigues Feijão e Valdinéia Soares Freitas, pela ótima convivência no laboratório, pela amizade, carinho e palavras de incentivo; durante os momentos difíceis;

Às amigas Marília Roberta de Carvalho, Michella Albuquerque e Viviane Pinho, pelos momentos alegres, pelo apoio e carinho;

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal: Carlos Eduardo Braga de Abreu, Daniel Farias, Franklin Aragão Gondim, Gyedre Araújo, Ian Valença, Luckas Huriel, Michella Albuquerque, Nathália Amaral, Paulo André Ferreira, Rosilene Mesquita, Stellamaris de Oliveira Paula, Thalita Montoril, Thiago Duarte de Menezes, Viviane Ruphental que colaboraram direta ou indiretamente para a realização do trabalho;

Ao professor Joaquim Enéas Filho, pela concessão da utilização do seu laboratório para a realização das análises e pelo seu apoio durante os experimentos;

Aos meus pais, Francisco Antônio de Alencar e Maria Evoneide Mendes de Sousa Alencar, por terem me deixado como maior herança, a educação, e pelo amor, carinho e dedicação a mim dedicados durante toda minha vida e pela renúncia que fizeram para o meu crescimento pessoal e profissional;

Ao meu esposo, Allisson dos Santos Cordeiro, por ser o grande amor da minha vida, pelo incentivo, apoio, amor e carinho nas situações mais difíceis e pela compreensão nos momentos de ausência;

Aos meus irmãos, Hiara Lígia Mendes Alencar e Carlos Eduardo Mendes de Alencar, por compartilharem comigo inúmeros momentos de alegria e por sempre me apoiarem.

A Deus, por ter me permitido chegar ao fim dessa difícil jornada e alcançar mais essa conquista em minha vida.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível” (Charles Chaplin).

RESUMO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta oleaginosa, pertencente à família *Euphorbiaceae*, cujas sementes são reconhecidas como matéria-prima com potencial para a produção de óleo. Essa planta também é considerada tolerante a condições adversas, tais como déficit hídrico e deficiência nutricional do solo, o que favorece o seu cultivo em regiões áridas e semiáridas. Objetivou-se avaliar os efeitos do estresse salino sobre a germinação e a mobilização das reservas de sementes e plântulas de pinhão-manso, por meio de análises bioquímicas, fisiológicas e ultraestruturais. Os parâmetros germinativos foram negativamente afetados pelo estresse salino, observando-se reduções significativas principalmente no percentual de germinação e no índice de velocidade de germinação. Similarmente, a matéria seca, avaliada no eixo embrionário e no endosperma, foi reduzida pela salinidade. Com relação aos compostos de reserva, os lipídios foram os mais abundantes, correspondendo a 64,0% da matéria seca do endosperma da semente quiescente. Estes compostos apresentaram forte retardo em sua mobilização em condição de estresse salino. As proteínas, a segunda reserva mais abundante (21,3%), também tiveram sua mobilização severamente afetada pelo tratamento salino. O amido foi detectado em pequena quantidade (5,5%), porém, verificou-se o aumento transiente de seu teor aos 5 dias após a semeadura (DAS), que coincidiu com a intensa mobilização de lipídios, em condições controle. Entretanto, em condições de estresse salino, o amido foi pouco mobilizado. Os produtos da mobilização das reservas, em condições controle, principalmente os açúcares não-redutores e aminoácidos livres aumentaram no endosperma, enquanto que, sob condições de salinidade, eles foram pouco alterados. Além disso, as análises citoquímicas e ultraestruturais confirmaram a abundante quantidade de lipídios e proteínas, sendo detectados inúmeros corpos proteicos e lipídicos no citoplasma das células endospermicas dessas sementes. A salinidade também promoveu alterações morfológicas e ultraestruturais nas células endospermicas durante a germinação e desenvolvimento de plântulas. O presente estudo também avaliou o metabolismo lipídico através da análise da composição dos ácidos graxos do endosperma e da análise da atividade enzimática e da expressão gênica das enzimas lipase, liase do isocitrato e sintase do malato. Os ácidos graxos insaturados foram os mais abundantes, destacando-se o oleico e o linoleico-linolênico, que apresentaram incrementos em seus teores, em condições controle, ao longo do período avaliado, porém, sob estresse salino foram pouco alterados. A lipase apresentou incremento na sua atividade ao longo da germinação, que coincidiu com a intensa

mobilização de lipídios observada no controle. Similarmente, a redução dessa atividade foi correspondente ao retardo na mobilização dos lipídios em condição de estresse salino. A atividade enzimática da liase do isocitrato não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos até às 96 horas após a semeadura (HAS), porém após esse período, verificaram-se as maiores reduções na condição de estresse salino, quando comparado ao controle. Já a atividade da sintase do malato foi significativamente maior em condições controle até às 144 HAS, entretanto, a partir desse período, essa atividade se mostrou superior em condições salinas. Verificaram-se reduções na atividade dessas enzimas em decorrência do estresse, o que teve correlação com as mudanças na expressão dos genes da lipase e liase do isocitrato. Portanto, pode-se concluir que a salinidade contribuiu para o retardo na mobilização dos lipídios, a principal reserva encontrada nas sementes de *J. curcas*, o que foi correlacionado a redução na atividade das enzimas envolvidas no seu metabolismo.

Palavras-chave: ácidos graxos, amido, enzimas do ciclo do glioxilato, expressão gênica, *Jatropha curcas* L., lipídios, proteínas, salinidade, microscopia óptica e eletrônica.

ABSTRACT

Jatropha curcas L. is an oilseed species belonged to Euphorbiaceae family, whose seeds are recognized as promising source for biodiesel production. Its ability to survive in adverse conditions, such as water stress and poor nutritional soil, is noteworthy, which favors its cultivation in arid and semiarid regions. Here we evaluate the negative effects promoted by NaCl salt stress on seed germination, reserve mobilization of *J. curcas* through biochemical, physiological and ultrastructural analysis. The seed germination parameters were significantly affected by salt stress, being observed that the main parameters affected were germination percentage and germination speed index. Similarly, the embryo and endosperm dry mass were reduced by Na⁺ and Cl⁻ increase in the medium. Considering the reserve compounds, the most abundant reserve of these seeds were the lipids, which corresponded to 64.0% of endosperm seed quiescent dry mass. They showed a stronger delay in reserve mobilization under saline conditions. Proteins were the second most important reserve (21.3%), being severally affected by salinity. The starch was detected in little amount (5.5% of quiescent seed dry mass), however there was a transient increase in this contents at 5 DAI (days after imbibition), which was correlated to the intense lipid mobilization, in control conditions. On the other hand, in salinity, it was observed that starch mobilization was reduced. The seed reserve products (mainly non-reducing sugars and free amino acids) were increased in endosperm in control in relation to quiescent seed, during germination, whereas for salt conditions, these products were few changed. Additionally, cytochemical and ultrastructural analyses confirmed the large amount of protein and lipid bodies in endosperm cells, reaching the identification of a huge amount of protein and lipid bodies. Salt stress promoted morphological and ultrastructural changes in endospermic cells, during germination and seedling development confirming the biochemical analyses. The present study also evaluated the lipid metabolism, using the fatty acid composition analysis and enzymatic and expression genic analyses for lipase, isocitrate liase, malate sintase. The unsaturated fatty acids were the most abundant, highlighting oleic (C18:1) and linoleic-linolenic (C18:2; C18:3), showing increase in their contents, in control conditions, during the evaluated period. However, the fatty acids practically were not changed in salinity conditions. Lipase showed increase in their activity during germination, which corresponded to intense mobilization in lipids in control. In similar way, the reduction of this activity happened in salinity, correlating to lipid delay mobilization. The evident delay of protein and oil body mobilization could strongly affect

initial seedling development. The liase isocitrate activity did not show significant differences between treatments until 96 hours after imbibition (HAI), however, following this period, it was verified the strongest reduction in salt stress condition. The activity of malate synthase was not significantly higher in control conditions until 144 HAI, however, following this period, this activity was higher in salinity. It were verified reductions in enzymatic activity due to salt stress, which were correlated to gene expression changes of lipase and isocitrate lyase. Therefore, salinity contributed negatively to lipid mobilization, the main reserve of *J. curcas* seeds, which was correlated to reduction in activity of the enzymes involved in lipid metabolism.

Keywords: *Jatropha curcas* L, fatty acids, gene expression, glyoxylate cycle enzymes, lipids, proteins, salinity, starch, optic and electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O metabolismo dos lipídios e o ciclo do glioxilato.....	26
Figura 2. Cadeia produtiva do pinhão-manso.....	34
Figura 3. Sementes de pinhão-manso em diferentes dias de germinação.....	40
Figura 4. Percentagem de germinação, índice de velocidade de germinação e tempo médio de germinação de sementes de pinhão-manso submetidas a doses crescentes de NaCl.....	58
Figura 5. Massas secas do eixo embrionário e do endosperma de sementes de pinhão-manso durante a germinação e estabelecimento da plântula, sob condições controle e de estresse salino.....	59
Figura 6. Teores de Na ⁺ no eixo embrionário e no endosperma de sementes de pinhão-manso sob condições controle e de estresse salino.....	61
Figura 7. Teores de Cl ⁻ no eixo embrionário e no endosperma de sementes de pinhão-manso sob condições controle e de estresse salino.	62
Figura 8. Teores de K ⁺ no eixo embrionário e no endosperma de sementes de pinhão-manso sob condições controle e de estresse salino.....	63
Figura 9. Teores de lipídios, proteínas e amido em endospermas de sementes de pinhão-manso sob condições controle e de estresse salino	65
Figura 10. Teores de açúcares solúveis, açúcares redutores, açúcares não redutores e aminoácidos livres em endospermas de sementes de pinhão-manso sob condições controle e de estresse salino.....	66
Figura 11. Seções transversais de endospermas de sementes quiescentes de pinhão-manso evidenciando corpos protéicos, parede celular e corpos lipídicos.....	68
Figura 12. Seções transversais de endospermas de sementes de pinhão-manso coradas com Xylidine Ponceau, evidenciando os corpos proteicos.....	68
Figura 13. Seções transversais de endospermas de sementes de pinhão-manso coradas com Sudan IV, evidenciando os corpos lipídicos.....	69
Figura 14. Seções transversais de endosperma de sementes de pinhão-manso coradas com periodic acid-Schiff (PAS) evidenciando parede celular.....	70
Figura 15. Seções transversais de endospermas de sementes de pinhão-manso coradas com Nilo Red, evidenciando os corpos proteicos e lipídicos.....	71
Figura 16. Ultramicografias de endospermas de sementes de pinhão- manso.....	73

Figura 17. Teores dos ácidos caprílico, capríco, láurico e mirístico em endospermas de sementes de pinhão-mansó submetidas aos tratamentos controle e salino.....	75
Figura 18. Teores dos ácidos palmítico, palmitoleico, esteárico e oleico em endospermas de sementes de pinhão-mansó submetidas aos tratamentos controle e salino.....	76
Figura 19. Teores dos ácidos graxos linoleico + linolênico, araquídico e erúcido de endospermas de sementes de pinhão-mansó em condições controle e de estresse salino.....	78
Figura 20. Teores dos ácidos graxos beênico e lignocérico de endospermas de sementes de pinhão-mansó em condições controle e de estresse salino.....	79
Figura 21. Atividade da lipase, liase do isocitrato e sintase do malato de endospermas de sementes de pinhão-mansó sob condições controle e de estresse salino.....	81
Figura 22. Análise eletroforética em gel de agarose a 1%, evidenciando as bandas de RNA ribossomal 18S e 28S.....	83
Figura 23. Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação do gene Actin 11 para avaliação da qualidade do cDNA.....	83
Figura 24. Expressão relativa dos genes da família multigênica da liase do isocitrato e das isoformas da lipase triacilglicerol I e II.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de genes de interesse e constitutivos	52
Tabela 2. Temperatura de anelamento selecionada para os genes testados como constitutivos e genes alvos.....	55
Tabela 3. Valores médios da concentração de RNA e das relações de absorvância em amostras de RNA de endospermas de sementes de pinhão-mansó durante a germinação em condições controle e de estresse salino.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT	Azul de toluidina
cDNA	DNA complementar
Ct	Cycle threshold
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
DAS	Dias após a semeadura
DAI	Days after imbibition
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
dS m ⁻¹	deciSiemens por metro
ha	Hectares
HAS	Horas após a semeadura
IVG	Índice de velocidade de germinação
mM	milimolar
MS	Matéria seca
PAS	Periodic acid-schiff
Prot	Proteína
Pb	Pares de bases
RPM	Rotações por minuto
RT – PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da DNA polimerase
RT – qPCR quantitativa	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da DNA polimerase quantitativa
SQ	Semente quiescente
T	Toneladas
TAG	Triacilgliceróis
Tm	Temperatura de desnaturação
TMG	Tempo médio de germinação
% G	Porcentagem de germinação
XP	Xylidine Ponceau
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Justificativa	18
1.2 Hipótese	22
1.3 Objetivos	22
<i>1.3.1 Objetivo geral</i>	22
<i>1.3.2 Objetivos específicos</i>	22
1.4 Revisão de literatura	23
<i>1.4.1 Aspectos gerais da germinação das sementes</i>	23
<i>1.4.2 Compostos de reserva das sementes e seu papel na germinação desenvolvimentodas plântulas</i>	23
<i>1.4.2.1 Mobilização das reservas lipídicas</i>	25
<i>1.4.2.2 Importância dos ácidos graxos para as sementes oleaginosas</i>	27
<i>1.4.3 Efeitos dos estresses salino e hídrico sobre a germinação</i>	28
<i>1.4.4 O pinhão-manso (Jatropha curcas L.)</i>	29
<i>1.4.4.1 Estudos sobre o óleo das sementes</i>	29
<i>1.4.4.2 Estresse salino e o pinhão-manso</i>	30
<i>1.4.4.3 Cultivo e produção de biocombustíveis</i>	31
<i>1.4.4.4 Características gerais do pinhão-manso (Jatropha curcas L.)</i>	32
2 MATERIAL EMÉTODOS	35
2.1 Estratégia experimental	35
2.2 Experimento I - Avaliação da germinação de sementes de pinhão-manso submetidas a diferentes doses de NaCl	36
<i>2.2.1 Material vegetal, testes de germinação e tratamentos</i>	36
<i>2.2.2 Delineamento experimental e análise estatística</i>	36
2.3 Experimento II - Efeitos da salinidade na germinação, na matéria seca e nos teores de íons íons inorgânicos	38
<i>2.3.1 Germinação e determinação da matéria seca ao longo da germinação</i>	38
<i>2.3.2 Determinação dos teores de íons inorgânicos</i>	38
<i>2.3.3 Delineamento experimental e análise estatística</i>	39

2.4 Experimento III - Caracterização da mobilização das reservas das sementes e de plântulas de pinhão-mansó sob condições de estresse salino.....	39
2.4.1 Reservas das sementes e compostos de hidrólise.....	40
2.4.1.1 Lipídios totais.....	40
2.4.1.2 Proteínas totais.....	41
2.4.1.3 Amido.....	42
2.4.1.4 Carboidratos solúveis, redutores e não-redutores.....	42
2.4.1.5 Aminoácidos solúveis.....	44
2.4.2 Delineamento experimental e análise estatística.....	44
2.4.3 Análises por microscopia.....	45
2.4.3.1 Análises citoquímicas.....	45
2.4.3.2 Microscopia confocal.....	45
2.4.3.3 Microscopia eletrônica de transmissão.....	46
2.4.4 Determinação dos ácidos graxos.....	47
2.4.4.1 Obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos.....	47
2.4.4.2 Quantificação dos ésteres metílicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).....	48
2.5 Experimento IV - Avaliação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídios durante a germinação das sementes e desenvolvimento das plântulas de pinhão-mansó submetidas ao estresse salino.....	48
2.5.1 Coleta do material para as análises enzimáticas e expressão gênica.....	48
2.5.2 Extratos enzimáticos.....	49
2.5.3. Lipase (E.C.3.1.1.1).....	49
2.5.4 Liase do isocitrato (E.C. 4.1.3.1).....	50
2.5.5 Sintase do malato (E.C. 2.3.3.9).....	50
2.5.6 Concentração de proteína.....	50
2.5.7 Delineamento experimental e análise estatística.....	51
2.5.8 Análise da expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídios.....	52
2.5.8.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers).....	52
2.5.8.2 Extração do RNA Total.....	53
2.5.8.3 Quantificação e pureza do RNA Total.....	54
2.5.8.4 Integridade do RNA total.....	54

2.5.8.5 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	54
2.5.7.6 PCR semi-quantitativa.....	55
2.5.8.7 RT – qPCR.....	55
2.5.8.8 Análise dos dados de expressão por RT-qPCR.....	56
3 RESULTADOS.....	57
3.1 Experimento I - Avaliação da germinação de sementes de pinhão-mans submetidas a diferentes doses de NaCl.....	57
3.1.1 Parâmetros germinativos.....	57
3.2 Experimento II – Efeitos da salinidade na germinação, na matéria seca e nos teores de íons inorgânicos.....	59
3.2.1 Determinação da matéria seca ao longo da germinação.....	59
3.2.2 Teores de íons inorgânicos no endosperma e eixo embrionário durante a germinação.....	60
3.3 Experimento III – Caracterização da mobilização das reservas das sementes de pinhão-mans	63
3.3.1 Compostos de reserva e produtos de hidrólise.....	63
3.3.2 Avaliação citoquímica da mobilização de reservas.....	67
3.3.3 Avaliação da mobilização de reservas por microscopia confocal.....	70
3.3.4 Avaliação ultraestrutural das sementes de pinhão-mans	72
3.3.5 Composição dos ácidos graxos.....	74
3.4 Experimento IV – Avaliação da atividade das enzimas do metabolismo lipídico das sementes e plântulas de pinhão-mans	80
3.4.1 Análise enzimática das enzimas do metabolismo lipídico.....	80
3.4.2 Análise da expressão gênica das enzimas do metabolismo lipídico.....	82
3.4.2.1 Qualidade do cDNA obtido pela transcrição reversa.....	84
3.4.2.2 Perfil da expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídios por RT-qPCR.....	84
4 DISCUSSÃO.....	86
5 CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS.....	97
APÊNDICE.....	110
ANEXO.....	112

1 INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

A salinidade representa um dos mais sérios problemas ambientais que afeta negativamente a produtividade de importantes culturas agrícolas (KUMAR *et al.*, 2008; DÍAZ-LÓPEZ *et al.*, 2012). Aproximadamente 20% das terras cultivadas do mundo e em torno de metade das áreas irrigadas são afetadas pela salinidade (FAO, 2005; DÍAZ-LÓPEZ *et al.*, 2012). As regiões áridas e semiáridas do planeta podem ter o agravamento desse problema, por possuírem uma tendência natural de acumulação de sais no solo, o que ocorre devido aos baixos índices pluviométricos e as elevadas taxas de evapotranspiração, causada pelas altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar (DÍAZ-LOPES *et al.*, 2012).

Em áreas agricultáveis, os manejos inadequados da água de irrigação e do solo têm sido apontados como fatores relevantes no processo de salinização dos solos (GHEYI, 2000). Além disso, a expansão da agricultura em regiões áridas e semiáridas, o uso intensivo da irrigação e fertilização podem contribuir para o aumento da salinização dos solos, devido ao incremento progressivo de sais oriundos da má qualidade da água utilizada para irrigação (CHAVES *et al.*, 2008). O impacto dos sais sobre o potencial osmótico dos solos reduz a absorção de água pelas raízes e altera, subsequentemente, o balanço hídrico da planta. Em adição, a absorção excessiva de íons tóxicos (principalmente Na^+ e Cl^-) pode causar distúrbios fisiológicos na planta (ZHU, 2001; MUNNS, 2002).

A germinação, processo chave no metabolismo vegetal, que permite ao embrião crescer e se transformar em um organismo fotossintético independente (BEWLEY *et al.*, 2013). Esta etapa é determinante no ciclo de vida das plantas (GUAN *et al.*, 2009), sendo afetada por muitos fatores bióticos e abióticos, tais como: temperatura, salinidade, luminosidade, alcalinidade, disponibilidade de água e concentração de oxigênio. Temperatura, salinidade e alcalinidade são os principais fatores que limitam a germinação de muitas espécies (LIN; TANG, 2005; GUAN *et al.*, 2009). Além desses fatores, o estresse hídrico também compromete o início da germinação, assim como todas as etapas subsequentes do crescimento e desenvolvimento da plântula (LIN; TANG, 2005). Como resultado da redução da água disponível no solo, geralmente, há elevação na concentração de

sais solúveis do meio, o que também pode influenciar na resposta germinativa das espécies devido aos efeitos negativos dos sais (LIN; TANG, 2005).

Muitos pesquisadores têm reportado como um dos efeitos iniciais da exposição das plantas ao estresse salino, o retardamento na germinação e no desenvolvimento inicial das plântulas (PRISCO, 1980; MUNNS, 2002; PARIDA; DAS, 2005). De modo geral, as plantas são mais sensíveis aos efeitos dos sais durante a germinação de suas sementes do que na fase de crescimento vegetativo, sendo que essa sensibilidade varia dependendo da espécie vegetal, do nível de estresse e do tipo de sal existente no solo (PRISCO, 1980; RAMOLIYA *et al.*, 2003). De acordo com a tolerância à salinidade, as plantas são classificadas em dois grupos: as halófitas, que são as plantas tolerantes à salinidade, e que desenvolveram estratégias para enfrentar o excesso de íons na solução do solo. Por outro lado, as glicófitas, que constituem a maioria das espécies cultivadas, são plantas sensíveis aos sais e não tolera longa ou mesmo breve exposição ao ambiente salino (GREENWAY; MUNNS, 1980).

O estresse salino afeta a germinação tanto por efeitos osmóticos, causando inibição ou atraso da germinação, como através da toxicidade iônica, que pode levar a inviabilidade das sementes (AL-KHATEEB, 2006). Embora a alta salinidade possa inibir a germinação, o seu efeito é incrementado quando ocorre juntamente em condições de elevadas temperaturas (LIN; TANG, 2005; GUAN *et al.*, 2009). Secundariamente, a salinidade também induz o estresse oxidativo, ao provocar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *reactive oxygen species*), tais como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e os radicais livres: superóxido (•O₂⁻) e hidroxil (•OH) (GUAN *et al.*, 2009). As espécies reativas de oxigênio são usualmente consideradas moléculas tóxicas para a fisiologia e desenvolvimento das plantas, podendo causar distúrbios no desenvolvimento das sementes e nos processos germinativos (APEL; HIRT, 2004; AZEVEDO-NETO *et al.*, 2008).

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é uma oleaginosa pertencente à família Euphorbiaceae com ampla distribuição nas regiões áridas e semiáridas do globo terrestre (HELLER, 1996). Essa espécie é nativa da América tropical, com origem provável a partir do México e de alguns países da América Central como a Nicarágua (CONTRAN *et al.*, 2013). No Brasil, essa espécie vem sendo amplamente cultivada em várias regiões, como o Sudeste, o Centro-Oeste e o Nordeste, devido à sua rusticidade e fácil aclimação a diferentes condições edafoclimáticas. Por ser uma espécie exigente com relação à luminosidade e, aparentemente, tolerante à seca, pragas e insetos, o pinhão-mansão tem sido considerada uma boa opção agrícola para o semiárido nordestino (ARRUDA *et al.*, 2004).

Essa planta é uma das oleaginosas apontadas como produtoras de sementes potenciais para o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (TEIXEIRA, 2005; LAVIOLA *et al.*, 2010). A sua adoção como cultura favorável para atender ao programa nacional de produção de biodiesel se deve principalmente: ao elevado potencial de rendimento de grãos, por ser uma espécie não alimentar e ao seu manejo ser compatível com o perfil da agricultura familiar (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). A oleaginosa vem sendo implantada em diversas regiões do Brasil, porém os genótipos usados nos plantios ainda não são totalmente conhecidos geneticamente, e o seu melhoramento ainda está em fase de estudo e testes no campo (LAVIOLA *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, a Embrapa Agroenergia tem atuado ativamente na pesquisa com pinhão-manso e seu banco de germoplasma com 220 acessos, vem subsidiando os programas de melhoramento desta espécie, visando obter melhorias no rendimento, na produtividade, qualidade do óleo e maior tolerância aos estresses bióticos e abióticos (LAVIOLA *et al.*, 2011). Além dessas pesquisas, também está em execução o projeto BRJATROPHA financiado pelo Ministério de Ciência e Tecnologia, que engloba várias instituições de pesquisa e universidades brasileiras.

A produtividade do pinhão manso é muito variável, dependendo da região, do método de cultivo, dos tratamentos culturais, bem como da regularidade pluviométrica e da fertilidade do solo. Segundo BRASIL (1985), a produção anual de sementes pode atingir de 3,0 a 4,0 t ha⁻¹, dependendo do sistema de cultivo. Purcino e Drummond (1986) observaram que o cultivo pinhão manso, em uma área irrigada com boa fertilidade do solo, apresentou produção de 2,0 t ha⁻¹ de sementes, a partir do segundo ano de cultivo. Por outro lado, Drummond *et al.* (2010) observaram produção em torno de 0,330 t ha⁻¹ de sementes, sob cultivo em condições de sequeiro, enquanto que em áreas irrigadas, foi observada a produtividade 1, 2 t ha⁻¹, em área irrigada, já no primeiro ano de cultivo em Petrolina-PE.

Os efeitos da salinidade sobre a fisiologia e a bioquímica do processo germinativo variam de acordo com as fases da germinação. Em geral, a protrusão da radícula é mais tolerante ao estresse salino do que o crescimento do eixo embrionário, que resulta no estabelecimento da plântula (PRISCO *et al.*, 1981). A mobilização de reservas é um dos processos mais afetados pela salinidade durante a germinação, sendo fundamental para que o eixo embrionário se desenvolva, o retardo na mobilização pode estar associado à inibição ou retardo do processo germinativo (PRISCO *et al.*, 1981; MARQUES *et al.*, 2013). Dessa forma, torna-se extremamente relevante ampliar os conhecimentos sobre a germinação e

estabelecimento de plântulas cultivadas em áreas que enfrentem problemas com a salinidade dos solos, como exemplo o pinhão-manso.

Os efeitos do estresse salino sobre plântulas estabelecidas de pinhão-manso já é bastante descrito na literatura, entretanto, apesar da grande demanda de informações sobre essa espécie, ainda são escassos ou inexistentes estudos envolvendo a germinação e o estabelecimento das plântulas de pinhão-manso submetidas a esse estresse. Dessa forma, por ser uma espécie indicada para o cultivo no semiárido nordestino, que é uma região que enfrenta problemas com o excesso de sais no solo devido principalmente as práticas de agricultura irrigada, torna-se relevante a realização de estudos sobre o efeito do estresse salino sobre os processos germinativos e de mobilização das reservas de sementes e plântulas de pinhão-manso. Adicionalmente, é importante destacar que há grande carência de estudos que envolvam as enzimas do metabolismo lipídico para as sementes de pinhão-manso, tanto no âmbito bioquímico como no molecular, bem como que caracterizem as alterações ultraestruturais das células de endospermas durante a germinação em condições de estresse salino.

1.2 Hipótese

A germinação das sementes e o desenvolvimento da plântula de pinhão-manso são afetados pelo estresse salino devido aos efeitos osmóticos e tóxicos dos íons sobre a mobilização de reservas endospermicas. Tais efeitos podem estar associados a danos nas estruturas celulares e à redução das atividades das enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídios.

1.3 Objetivos

1.3.1. *Objetivo geral*

Avaliar os efeitos do estresse salino sobre a germinação, a mobilização das reservas da semente e o desenvolvimento da plântula de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), com o intuito de caracterizar os padrões bioquímicos, moleculares e ultraestruturais.

1.3.2 *Objetivos específicos*

- Analisar o comportamento germinativo das sementes de pinhão-manso submetidas ao estresse salino;
- Descrever as mudanças morfofisiológicas das sementes e plântulas de pinhão-manso, durante a germinação;
- Caracterizar os principais compostos de reserva das sementes de pinhão-manso, bem como a mobilização dessas reservas;
- Descrever as alterações citoquímicas e ultraestruturais nas células do endosperma das sementes de pinhão-manso decorrentes da exposição ao estresse salino;
- Estudar o efeito do estresse salino na atividade e expressão gênica das enzimas lipase, liase do isocitrato e sintase do malato, verificando de que forma o metabolismo dos ácidos graxos pode ser afetado em função dos distúrbios na atividade dessas enzimas.

1.4 Revisão de literatura

1.4.1 Aspectos gerais da germinação das sementes

As plantas superiores apresentam como uma de suas principais características a formação de sementes, as quais contêm o embrião protegido por tegumento derivado dos tecidos de origem materna (RAVEN *et al.*, 2007). A semente contendo o embrião (que é uma planta em miniatura) é estruturalmente e fisiologicamente equipada para desempenhar seu papel como unidade dispersora das plantas espermatófitas e manter a diversidade de muitas espécies vegetais (RAVEN *et al.*, 2007).

A germinação corresponde ao conjunto de eventos fisiológicos que começa com a hidratação da semente quiescente, terminando com o alongamento do eixo embrionário e protrusão da radícula (BEWLEY *et al.*, 2013). Iniciada a germinação das sementes, estas passam por processos que envolvem mudanças morfo-anatômicas, fisiológicas e bioquímicas no metabolismo (BEWLEY, 1997), as quais podem ser detectadas *in situ* por processos citoquímicos e histoquímicos (GALLÃO *et al.*, 2006). Tais processos incluem numerosos eventos, tais como: reparo de DNA, síntese de proteínas e de enzimas que atuam nos processos respiratórios e na mobilização das reservas (BEWLEY; BLACK, 1994; BEWLEY, 1997; BEWLEY *et al.*, 2013). Após a germinação, tem início uma etapa de intensa mobilização das reservas armazenadas no endosperma ou nos cotilédones, durante o desenvolvimento e maturação da semente (BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004a).

1.4.2 Compostos de reserva das sementes e seu papel na germinação e desenvolvimento das plântulas

Os carboidratos, os lipídios e as proteínas são os principais compostos de reserva estocados durante os estádios tardios de desenvolvimento das sementes. Em geral, essas substâncias são acumuladas nos cotilédones, ou no endosperma e, menos frequentemente, no perisperma (SUDA; GIORGINI, 2000). A composição química das sementes é determinada

por fatores genéticos e ambientais, variando bastante entre as espécies ou mesmo entre variedades e cultivares de uma mesma espécie, bem como com o habitat em que se desenvolvem (BUCKERIDGE *et al.*, 2004a).

Os principais compostos derivados dos carboidratos que atuam como reservas das sementes são: a sacarose, os oligossacarídeos da série rafínosica, o amido e os polissacarídeos de parede celular. Quanto às proteínas de reserva, quatro grandes grupos são encontrados em vários tipos de sementes: as albuminas, as globulinas, as prolaminas e as glutelinas. Já os lipídios de reservas são armazenados na forma de triacilgliceróis (BEWLEY; BLACK, 1994; BUCKERIDGE *et al.*, 2004a).

O acúmulo das substâncias de reserva durante a formação das sementes tem basicamente por função a manutenção do desenvolvimento do embrião, podendo também ser fonte de energia para manter os processos metabólicos em funcionamento e/ou fonte de matéria para a construção de tecidos vegetais que irão constituir as plântulas (BUCKERIDGE *et al.*, 2004b; GALLÃO *et al.*, 2007). Os carboidratos e os lipídios servem como fonte de energia e de carbono para a germinação das sementes e desenvolvimento das plântulas, enquanto as proteínas armazenam nitrogênio e enxofre, os quais são utilizados para a síntese de novas proteínas e compostos essenciais para o desenvolvimento das plântulas (CORTE *et al.*, 2006).

Estudos recentes têm utilizado técnicas de microscopia eletrônica para caracterizar a mobilização dos principais compostos de reserva encontrados nas sementes (BOREK; RATAJCZAK, 2002; MUCCIFORA *et al.*, 2010; REALE *et al.*, 2012). Análises ultraestruturais e enzimáticas revelaram o papel da sacarose na mobilização de lipídios de reserva em sementes de *Lupinus* (BOREK; RATAJCZAK, 2002). Nesses estudos foi possível concluir que o baixo nível de açúcares solúveis nos tecidos acelera a mobilização dos compostos de reserva, enquanto que o alto nível de açúcares pode estimular a transferência de carbono dos lipídios para os aminoácidos.

A mobilização de reservas, com ênfase nas proteínas, foi estudada em *Mucuna pruriens* através de análises ultraestruturais e bioquímicas (MUCCIFORA *et al.*, 2010). A análise da mobilização de reservas utilizando métodos de microscopia óptica e eletrônica também foi realizada para as sementes de pinhão-manso (REALE *et al.*, 2012). Os efeitos dos estresses causados por NaCl, Na₂SO₄ e manitol sobre a mobilização dos lipídios estocados nos cotilédones e raízes foram avaliados por análises ultraestruturais em plântulas de alfafa, onde demonstrou-se que a resistência das plantas dicotiledôneas aos estresses abióticos pode ser investigada por estas análises (BARANOVA *et al.*, 2007). Os efeitos inibitórios do NaCl

sobre a mobilização das reservas cotiledonares das sementes e plântulas de cajueiro anão-precoce foi estudado recentemente por Marques et al. (2013), que observaram que o acúmulo de Na^+ e Cl^- inibiu a mobilização dessas reservas nessa espécie, reduzindo o transporte dos produtos de hidrólise das reservas para o eixo embrionário.

1.4.2.1 Mobilização das reservas lipídicas

Nas sementes oleaginosas, as principais reservas de estocagem são os lipídios, os quais se encontram na forma de triacilgliceróis (TAG), sendo armazenados em organelas denominadas de corpos lipídicos ou oleossomos (EASTMOND; GRAHAM, 2001; JOLIVET *et al.*, 2004). A matriz de TAG de um corpo lipídico é envolvida por uma monocamada de fosfolipídios, na qual está inserida a proteína chamada de oleosina, que regula o tamanho dessas estruturas, definindo o seu formato esférico e curvatura (BUCHANAN *et al.*, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2013). Estas características são importantes para regular a razão da superfície/ volume e facilitar a rápida degradação dos corpos lipídicos durante a germinação. (JOLIVET *et al.*, 2004). Os TAG que são degradados durante a germinação e estabelecimento da plântula servem como esqueletos de carbono e recursos energéticos (JOLIVET *et al.*, 2004).

Os TAG, presentes nos corpos lipídicos, são inicialmente clivados por lipases, liberando ácidos graxos que entram nos glioxissomos e são subsequentemente degradados pelas enzimas da β -oxidação, produzindo acetil-CoA (YANG *et al.*, 2009). Este, por sua vez, é convertido em sacarose através do ciclo do glioxilato e gluconeogênese, que contribuem para a conversão líquida de lipídios em carboidratos (BUCHANAN *et al.*, 2000; GRAHAM, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2013). A sacarose, produzida nos órgãos de reserva da semente é transportada para o eixo embrionário e serve de suporte de energia e carbono para o crescimento e desenvolvimento da plântula (BEEVERS, 1980). (Figura 1).

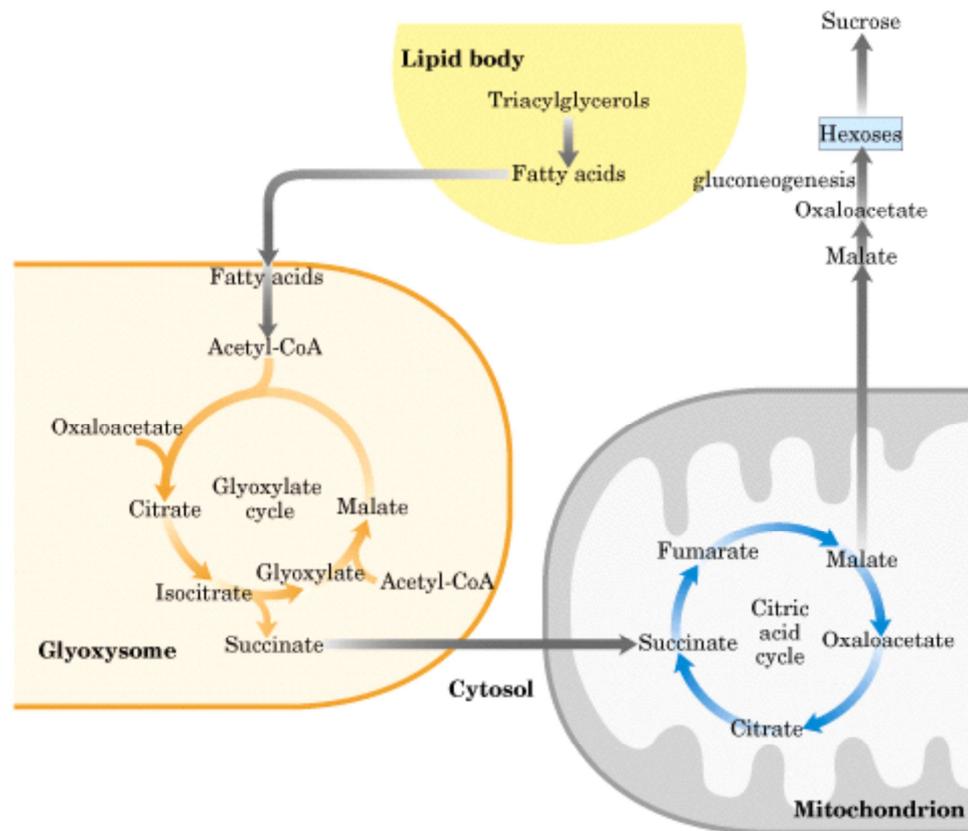


Figura 1. O metabolismo dos lipídios e o ciclo do glioxilato, segundo Eastmond e Graham (2001).

O ciclo do glioxilato possui duas enzimas-chaves: a sintase do malato e a liase do isocitrato, que realizam a conversão líquida de acetil Co-A em succinato (EASTMOND; GRAHAM, 2001). Essas enzimas vêm sendo exaustivamente estudadas na tentativa de elucidar sua importância no metabolismo dos lipídios de sementes oleaginosas (BALERONI *et al.*, 1997; BOREK; RATAJCZAK, 2002; EASTMOND; GRAHAM, 2001). De acordo com Eastmond *et al.* (2000), a eficiência da degradação dos lipídios estocados é essencial para o estabelecimento das plântulas, bem como para seu vigor e bom desempenho no campo. Em estudo pioneiro sobre o metabolismo dos lipídios, Baleroni *et al.* (1997) descreveram a atividade da liase do isocitrato e o seu envolvimento na mobilização dos lipídios e produção de carboidratos em sementes de canola.

Em estudo sobre os efeitos do estresse salino sobre a mobilização de reservas cotiledonares em plântulas de cajueiro anão-precoce, Marques *et al.* (2013) observaram que a mobilização das reservas lipídicas foi inibida pelo NaCl devido à redução da atividade da lipase. Estes autores também verificaram que o estresse salino não promoveu mudanças

significativas na atividade das enzimas liase do isocitrato e sintase do malato, em comparação ao controle. Em cotilédones de plântulas de *Beta vulgaris* submetidos ao estresse salino, De Los Reyes *et al.* (2003) observaram aumento na atividade da liase do isocitrato e sintase do malato induzida pela expressão dos seus genes, que coincidiu com aumento na expressão gênica da α -amilase (DE LOS REYES; MYERS; McGRATH, 2003).

1.4.2.2 Importância dos ácidos graxos para as sementes oleaginosas

A eficiente mobilização dos óleos estocados nas sementes oleaginosas é um fator essencial para o sucesso do estabelecimento das plântulas, sendo um fator preponderante para o desenvolvimento da planta também no campo (YANG *et al.*, 2009). A composição dos ácidos graxos é uma das características mais importantes reconhecidas para a boa qualidade dos óleos das culturas oleaginosas (YEILAGHI *et al.*, 2012). A indicação dos óleos vegetais para aplicação nutricional, industrial e farmacêutica é determinada pela composição dos ácidos graxos, que é bastante variável dependendo da espécie vegetal ou até mesmo da variedade (YEILAGHI *et al.*, 2012). Os ácidos graxos mais abundantes comumente encontrados em sementes oleaginosas são o palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2). As sementes de pinhão-mansão possuem os ácidos oleico e linoleico como os mais abundantes em seus endospermas, em seguida estão os ácidos palmítico e o esteárico (YANG *et al.*, 2009).

Alguns estudos têm demonstrado que o estresse salino pode alterar a composição dos ácidos graxos das sementes, e conseqüentemente afetar a mobilização dessas reservas e comprometer o crescimento e o desenvolvimento das plantas oleaginosas. Estudos como esse já foram realizados para o girassol, onde foi verificado um decréscimo nos teores do ácido linoleico no tratamento irrigado com água salina, em contrapartida foi verificado incremento do ácido oleico no tratamento com maior nível de salinidade (FLAGELLA *et al.*, 2004). O efeito da salinidade sobre o crescimento, a composição dos ácidos graxos também foi avaliado nas sementes da planta medicinal *Ocimum basilicum* (Lamiaceae), onde foi verificado que a composição dos ácidos graxos não foi afetada pelo estresse salino, sendo os principais ácidos detectados o α -linolênico, o palmítico e o linoleico.

1.4.3. Efeitos dos estresses salino e hídrico sobre a germinação e estabelecimento da plântula

A germinação das sementes e o crescimento inicial das plântulas são estágios cruciais para o estabelecimento das populações vegetais e a produtividade das culturas, especialmente sob condições adversas, como os estresses salino e hídrico (KHAN; GULZAR, 2003; AL-KHATEEB, 2006). Os efeitos negativos do estresse hídrico sobre a germinação já foram descritos em diversas espécies como o trigo (SOLTANI; GHOLIPOR; ZEINALI, 2006), o feijão (PRISCO *et al.*, 1981; GOMES-FILHO *et al.*, 1983; CUELLAR-ORTIZ *et al.*, 2008) e o rabanete (SILVA *et al.*, 2008), enquanto os efeitos negativos do estresse salino foram estudados em espécies como a soja (BERTAGNOLLI *et al.*, 2004) e o cajueiro anão-precoce (VOIGT *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2013).

O estresse salino inibe ou retarda a germinação, por causar déficit hídrico e também pela toxicidade iônica. Inicialmente, o estresse salino reduz o gradiente de potencial hídrico e restringe a absorção de água, retardando a embebição das sementes e consequentemente a protrusão da radícula (RAMOLYA; PANDLEY, 2003). Além disso, o estresse salino provoca efeitos tóxicos sobre vários processos bioquímicos e fisiológicos da semente, causados pelo acúmulo, principalmente, dos íons sódio e cloreto, desencadeando a redução da germinação e emergência da plântula ou podendo levar a sua morte (BEWLEY; BLACK, 1994; SOLTANI; GHOLIPOR; ZEINALI, 2006).

Algumas espécies apresentam elevada tolerância à salinidade (halófitas), requerendo inclusive um ambiente salino para que o seu ciclo de vida aconteça, apresentando melhor germinação em condições de salinidade. Entretanto os mecanismos responsáveis pela tolerância das halófitas ao estresse salino ainda não são muito estabelecidos (ASLAM *et al.*, 2011). Diferentemente das halófitas, a maioria das culturas é afetada pela salinidade quando a condutividade elétrica do extrato de saturação do solo é superior a $3,0 \text{ dS m}^{-1}$ (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2003). Estas culturas são denominadas glicófitas, sendo consideradas sensíveis à salinidade, por apresentarem o crescimento inibido ou retardado, mesmo em baixas concentrações de NaCl (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2003).

De modo geral, sabe-se que o estresse salino induz a inibição do crescimento das plântulas, que geralmente coincide com o atraso na mobilização das reservas das sementes para o desenvolvimento do eixo embrionário (VOIGT *et al.*, 2009). Em cajueiro anão-

precoce, estes mesmos autores verificaram que a mobilização das reservas proteicas foi mais afetada no início da germinação, enquanto que a mobilização das reservas lipídicas foi afetada apenas nos últimos estágios de plântulas analisados. Durante a germinação de girassol, o estresse salino reduziu a mobilização dos lipídios e induziu o acúmulo de açúcares solúveis tanto nos cotilédones como no hipocótilo (ASHRAF; WAHID, 2003).

Além dos efeitos dos sais sobre a germinação e o desenvolvimento das plântulas, o retardo da mobilização das reservas, principalmente da degradação dos TAG também foi observado em sementes de canola (BEN-MILED; ZARROUK; CHÉRIF, 2000). Apesar de já existirem vários estudos sobre a germinação e mobilização de reservas de oleaginosas, com relação às sementes de pinhão-manso, os estudos são escassos ou inexistentes, principalmente em condições de estresse salino.

1.4.4. O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)

1.4.4.1 Estudos sobre o óleo das sementes

O pinhão-manso vem se destacando economicamente devido as suas várias aplicações na indústria (OPENSHAW, 2000; ADEBOWALE *et al.*, 2006; ANNARAO *et al.*, 2008) e como fonte potencial de óleo para fins não alimentícios (KARMEE *et al.*, 2004). Recentemente, alguns estudos vêm sendo realizados sobre as características e propriedades do óleo extraído das sementes de pinhão-manso. Conforme Yang *et al.* (2009), o conteúdo de óleo das sementes de *J. curcas* é de aproximadamente 60,0% da massa seca do endosperma da semente quiescente, e dentre os ácidos graxos mais abundantes estão o palmítico, esteárico, oleico e linoleico. Estes autores também verificaram que as proteínas mais abundantes encontradas nessas sementes eram aquelas relacionadas às vias envolvidas na mobilização lipídica (YANG *et al.*, 2009). Além disso, outros estudos também mostraram que as proteínas mais abundantes no endosperma de sementes quiescentes estavam envolvidas com o catabolismo das reservas lipídicas, enquanto que as do embrião se relacionavam principalmente com a utilização dessas reservas (LIU *et al.*, 2009). Por outro lado, estudos envolvendo a análise transcriptômica mostraram resultados que podem ser utilizados para melhorar geneticamente as variedades de *J. curcas*, através de incrementos na produtividade do óleo e da qualidade agrônômica dessa espécie (COSTA *et al.*, 2010).

Recentemente, o DNA genômico de *J. curcas* foi decodificado com sucesso, podendo fornecer subsídios para o aumento da produtividade e realização dos programas de melhoramento genético através dos métodos de engenharia genética (SATO *et al.*, 2011). Ademais, estudos envolvendo o melhoramento genético de pinhão-mansó mostraram que os métodos de seleção genética combinada foram mais promissores que os métodos estratificados (BHERING *et al.*, 2013; LAVIOLA *et al.*, 2013).

1.4.4.2 Estresse salino e o pinhão-mansó

Os efeitos dos estresses salino e hídrico sobre o crescimento e desenvolvimento de plântulas de pinhão-mansó foi avaliado recentemente por vários autores (LOUREIRO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009a; SILVA *et al.*, 2009b; SILVA *et al.*, 2010; NERY *et al.*, 2009; KUMAR; SHARMA; MISHRA, 2010), bem como foram investigados as respostas fisiológicas destas plantas aos estresses isolados e combinados de salinidade e calor (SILVA *et al.*, 2012). Adicionalmente, os tratamentos combinados intensificaram os efeitos negativos do estresse salino, promovendo redução das taxas fotossintéticas, o acúmulo elevado de Na⁺ e Cl⁻ nas folhas, bem como acentuando os danos de membrana e peroxidação de lipídios (SILVA *et al.*, 2012).

O estresse salino combinado com o térmico promoveu o aumento na atividade da APX (peroxidase do ascorbato) e da SOD (dismutase do superóxido), bem como da catalase (SILVA *et al.*, 2012). Campos *et al.* (2012) avaliaram o efeito da salinidade sob a fotossíntese e a atividade das enzimas antioxidativas de plântulas de *J. curcas*, que verificaram que o sistema de remoção de espécies reativas de oxigênio (EROS) não é suficiente para amenizar o efeito danoso às folhas, causado pelo acúmulo desses radicais. Cai *et al.* (2011) relataram uma eficiente participação do sistema antioxidativo enzimático durante a germinação de sementes de *Jatropha curcas* sob condições controle, destacando o papel da enzima catalase como enzima importante para a germinação.

O efeito do estresse salino também foi avaliado durante a fase germinativa de pinhão-mansó. Lira *et al.* (2008) verificaram que a germinação das sementes de pinhão-mansó foi afetada pela salinidade em diferentes doses de NaCl (0, 2, 4 e 6 dS m⁻¹), porém as mesmas foram capazes de recuperar parte do potencial germinativo ao serem retiradas da condição estressante e transferidas para papel germitest umedecido com água destilada aos 9 dias após a semeadura, exceto no nível mais elevado de sal (6 dS m⁻¹). De forma similar, Andréo-Souza *et al.* (2010) observaram atraso no processo germinativo de sementes de pinhão-mansó,

especialmente nas doses mais elevadas de sal, sendo também verificado redução no crescimento das plântulas de pinhão-manso na solução salina com condutividade elétrica de 6 dS m⁻¹.

1.4.4.3 Produção de biocombustíveis

As mudanças climáticas em nosso planeta correspondem a um dos assuntos mais discutidos nas últimas décadas e permanecerão sendo tema para as seguintes. As emissões de gases que causam o efeito estufa, a partir do uso dos combustíveis fósseis, são um dos principais fatores que vem agravando essa situação (LIM; LEE, 2013). As determinações do protocolo de Kyoto, que visam reduzir as emissões de gases poluentes, incentivaram a busca por fontes de energias alternativas que fossem menos prejudiciais ao ambiente. Além disso, contribuindo para o uso dessas fontes de energia alternativas, estima-se que haverá aumento da demanda de petróleo nos próximos anos, ao mesmo tempo em que se prevê a redução da descoberta de novas fontes de petróleo (CARELS, 2009). Portanto, muitos países vêm buscando alternativas para o uso de energias limpas, e dentre elas se destacam os biocombustíveis. Entretanto, as energias renováveis ainda não são economicamente competitivas comparadas àquelas dos combustíveis fósseis (LIM; LEE, 2013).

No Brasil, a maioria do biodiesel produzido vem do óleo de soja, enquanto que a maioria do bioetanol vem da cana de açúcar. Entretanto, o Brasil possui uma enorme biodiversidade e muitas outras espécies podem ser importantes fontes para a produção de biocombustíveis (BHERING *et al.*, 2013). Atualmente, algumas espécies têm sido apontadas como potenciais para complementar, ou parcialmente substituir, a soja como fonte de óleo vegetal, tais como: a palma, o girassol, a canola, a mamona e o pinhão-manso. Entre as espécies mencionadas, o pinhão-manso produz óleo que é relativamente simples para conversão em biodiesel, tanto por reações de transesterificação químicas, como por reações mediadas por microorganismos (BERCHMANS; HIRATA, 2008). Além disso, o pinhão-manso é uma cultura não alimentar com grande adaptação às regiões semiáridas (LIM; LEE, 2013).

Por outro lado, as propriedades de *J. curcas* ainda não são completamente exploradas ou facilmente aplicáveis. Por razões técnicas e econômicas, o potencial total de *J. curcas* está longe de ser alcançado, e seus aspectos positivos ainda devem ser comprovados por trabalhos científicos (DIVAKARA *et al.*, 2010). Esta planta ainda não é domesticada e tanto a produção de suas sementes, como a de seu óleo é altamente variável. Para o

estabelecimento de melhores práticas do cultivo dessa espécie, ainda devem ser analisados: a seleção de material vegetal adequada, a melhoria no manejo, bem como os benefícios e os riscos ambientais do desenvolvimento dessa cultura (CONTRAN *et al.*, 2013).

1.4.4.4. Características gerais do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.)

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) é um arbusto perene, monóico, pertencente à família Euphorbiaceae, tribo Joannesieae. Esta espécie é nativa das Américas, sendo amplamente distribuída em áreas tropicais e subtropicais do mundo, especialmente na América Central e do Sul, África, Índia e Sudeste Asiático (HELLER, 1996). Plantas selvagens ou semicultivadas de pinhão-mansão podem crescer sob condições climáticas e de solo desfavoráveis, principalmente em áreas com baixa pluviosidade e secas extremas (KATWAL; SONI, 2003; ACHTEN *et al.*, 2010).

J. curcas é uma planta que pode atingir 3 m de altura, mas em condições favoráveis chega a variar de 5 a 6 m (CONTRAN *et al.*, 2013). Essa planta apresenta crescimento articulado, com descontinuidade morfológica entre os nós e sua dormência é induzida por flutuações de chuva e temperatura (HELLER, 1996, ANEXO A). Em climas caracterizados por estações secas, esta planta pode se tornar decídua, perdendo as folhas durante esse período (KUMAR; SHARMA, 2008, ANEXO A). A semente é formada por um tegumento que representa entre 30-40% da massa da semente, enquanto o remanescente corresponde a uma amêndoa branca, o endosperma, que contém o tecido que armazena o lipídio, o qual corresponde a 40-60% do peso seco do endosperma (KUMAR; SHARMA, 2008). Estas sementes contém um grande número de constituintes tóxicos para homens e animais, destacando-se os ésteres de forbol e a curcina, uma proteína inativadora de ribossomos, semelhante à ricina (LIN *et al.*, 2003). No entanto, alguns genótipos não tóxicos, livres de ésteres de forbol, já foram identificados no México (LIN *et al.*, 2003).

O pinhão-mansão é uma planta com múltiplas aplicações na agricultura, e nas indústrias química e petroquímica. Essa espécie tem papel importante na recuperação de solos contaminados com metais pesados e resíduos tóxicos, bem como no manejo e recuperação de solos em processo de erosão, contribuindo também para a recuperação de terrenos mal utilizados e por fornecer importante adubo verde (KUMAR; SHARMA, 2008). Outras aplicações são: uso medicinal (sementes, folhas, cascas e raízes), sericultura, alimentação animal (folhas), pesticidas e inseticidas (ésteres de forbol de sementes), fertilizantes (folhas e

tortas provenientes das sementes após extração dos óleos), produção de biodiesel e sabão (óleo extraído das sementes) (KUMAR; SHARMA, 2008).

Dentre as várias aplicações do pinhão-mansão, destaca-se o uso de suas sementes para a produção de biodiesel, dada a abundância de óleo nas mesmas com alto percentual de ácidos graxos monoinsaturados (oleico) e poliinsaturados (linoleico), os quais são muito apropriados para a produção desse combustível (WEN *et al.*, 2010). Além disso, o óleo das sementes de pinhão-mansão apresenta as seguintes propriedades: estabilidade para estocagem, baixa acidez, boa estabilidade de oxidação, quando comparada, por exemplo, ao óleo de soja e baixa viscosidade quando comparado ao óleo de mamona (TAPANES *et al.*, 2008). Após a prensagem das sementes para obtenção do óleo, a torta resultante pode ser aproveitada em digestores e gaseificadores para a produção de biogás. No Brasil, o uso do óleo de *J. curcas* vem aumentando devido a sua menor toxicidade em relação ao óleo extraído da mamona (MACIEL *et al.*, 2009).

A cadeia produtiva dos co-produtos e derivados que podem ser obtidos da extração de óleo das sementes de pinhão-mansão é bastante ampla, podendo gerar renda nas várias etapas de produção (Figura 2). Além disso, essa planta, devido às propriedades dos óleos de suas sementes, é considerada matéria-prima promissora para produção de biodiesel, além de ser uma espécie com grandes possibilidades de cultivo em regiões áridas, pois é resistente ao estresse hídrico e tem baixo custo de produção, sendo uma opção em áreas não-irrigadas (MACIEL *et al.*, 2009).

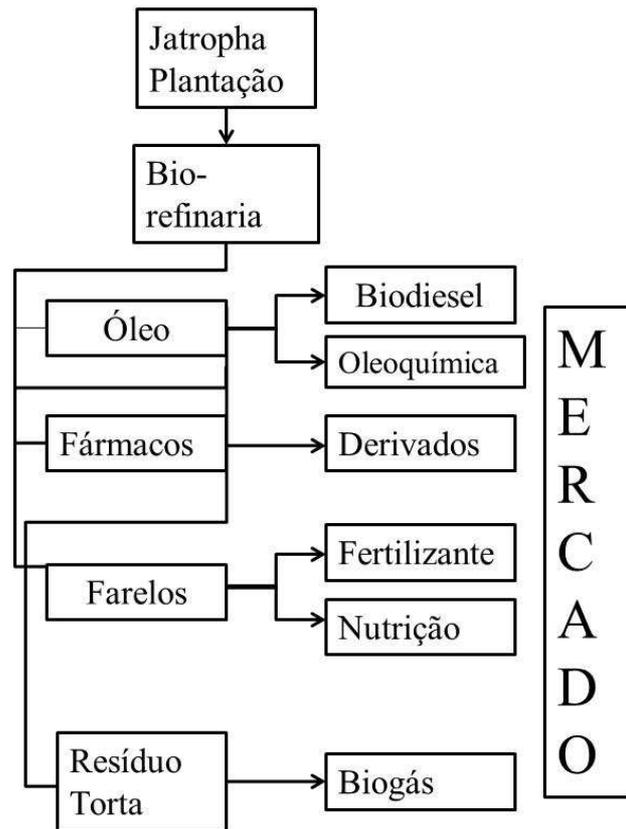


Figura 2. Cadeia produtiva do pinhão-mansão modificada de Kumar e Sharma (2008)

Para que o pinhão-mansão possa ser utilizado para a produção de biodiesel é crucial o desenvolvimento e estabelecimento de cultivares com alta produtividade, apresentando alto conteúdo de óleo, além de serem adaptados as condições de déficit hídrico (DIVAKARA *et al.*, 2010). Pesquisas envolvendo a caracterização da diversidade genética do banco de germoplasma pertencente à Embrapa Agroenergia vêm sendo realizadas com o intuito de identificar caracteres morfológicos de natureza qualitativa e quantitativa visando à incorporação de genótipos promissores ao programa de melhoramento dessa espécie (LAVIOLA *et al.*, 2010; LAVIOLA *et al.*, 2013).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estratégia experimental

Para caracterizar a germinação e os processos de mobilização das reservas das sementes e de plântulas de pinhão-manso submetidas ao estresse salino foram realizados quatro experimentos. Com os quais, pretendeu-se identificar os padrões bioquímicos, moleculares e ultraestruturais dessa etapa do desenvolvimento, bem como a influência do estresse salino sobre essa.

No *Experimento I*, foram realizados testes de germinação com os tratamentos com NaCl nas concentrações de 0 (controle), 50, 100 e 150 mM, para a seleção da dose de sal que afetasse significativamente a germinação e a reduzisse em cerca de 40 a 50%. Posteriormente, foi executado o *Experimento II*, no qual se realizaram testes de germinação com a dose de sal selecionada no primeiro experimento, bem como foram determinadas as massas secas do endosperma e eixo embrionário e os teores de íons inorgânicos ao longo da germinação (oito dias após a embebição da semente).

No *Experimento III*, usando a mesma dose de sal, analisaram-se, por métodos bioquímicos, os compostos de reserva das sementes de pinhão-manso e os produtos da mobilização dessas reservas ao longo da germinação. Além disso, foram feitas análises citoquímicas e ultraestruturais de endospermas de sementes quiescentes e com quatro e oito dias após a embebição. Por último, no *Experimento IV*, determinou-se a atividade das enzimas lipase, liase do isocitrato e sintase do malato, bem como se analisou a expressão dos seus genes, com o intuito de identificar possível correlação entre os níveis dos transcritos e as atividades enzimáticas.

2.2 Experimento I - Avaliação da germinação de sementes de pinhão-manso submetidas a diferentes doses de NaCl

2.2.1 Material vegetal, testes de germinação e tratamentos

As sementes de pinhão-manso foram obtidas da Fazenda Lagoa-Seca, Campina Grande-PB, fornecidas gentilmente pelo professor Dr. Pedro Dantas Fernandes, do Instituto Nacional do Semiárido (INSA). As sementes foram armazenadas a 4°C, sendo utilizadas ao longo de um ano. Os testes de germinação foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará.

Inicialmente, foram selecionadas sementes uniformes e com tegumento intacto, as quais foram desinfestadas com o fungicida Orthocid® a 2% por 10 min, seguida de lavagem com água destilada. Posteriormente, as sementes foram dispostas uniformemente sobre três folhas de papel germitest umedecidas com solução de NaCl a 0 (controle), 50, 100 e 150 mM, com volume equivalente a três vezes a massa das três folhas de papel germitest (substrato). Para cada tratamento, foram utilizadas 100 sementes divididas em cinco repetições de 20 sementes cada, sendo cada grupo distribuído em três folhas de papel germitest, dispostas em rolo, e mantidas dentro de potes de polietileno cobertos com plástico transparente. Os testes de germinação foram conduzidos em estufa tipo B.O.D ajustada à temperatura de 30°C, sob fotoperíodo de 12h de claro/12 h de escuro, conforme Andréo-Souza et al. (2010).

Foram avaliados os seguintes parâmetros germinativos: índice de velocidade de germinação (MAGUIRE, 1962), tempo médio de germinação (LABORIAU, 1983), e percentagem final de germinação (LABORIAU, 1983). A germinação foi contabilizada nos dias 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 DAS (dias após a sementeira) sendo consideradas germinadas as sementes que apresentaram raiz primária com 2 mm de comprimento. Durante esse experimento também foram estabelecido os tempos para avaliação da germinação para serem utilizados nos próximos experimentos. Os parâmetros germinativos foram assim determinados:

Índice de velocidade de germinação (IVG) - de acordo com a fórmula abaixo, segundo Maguire (1962):

$$IVG = (G_1 / N_1) + (G_2 / N_2) + (G_3 / N_3) + \dots + (G_n / N_n) \text{ onde:}$$

G_1, G_2, G_3 e G_n = número de sementes na primeira, segunda, terceira e última contagem de germinação.

N_1, N_2, N_n = número de dias após a semeadura na primeira, segunda, terceira e última contagem de germinação.

Tempo médio de germinação (TMG) - de acordo com a fórmula abaixo, segundo Laboriau (1983):

$$TMG = \Sigma(n_i \cdot t_i) / \Sigma n_i \text{ onde,}$$

n_i = número de sementes germinadas entre cada intervalo de tempo de contagem;

t_i = tempo decorrido entre o início da germinação e a i -ésima contagem.

Porcentagem de germinação (% G) – de acordo com a expressão abaixo, conforme Laboriau (1983):

$$\%G = (\Sigma n_i) / N \times 100 \text{ onde:}$$

Σn_i = número total de sementes germinadas;

N = Número de sementes postas para germinar.

2.2.2 Delineamento experimental e análise estatística

Para determinação dos parâmetros de germinação foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com quatro doses de NaCl (0, 50, 100 e 150 mM). Para cada tratamento foram utilizadas cinco repetições contendo 20 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento. Os resultados foram comparados por análise de variância (ANOVA) para avaliar a significância entre os fatores usando o teste F. Quando a diferença foi significativa ($P \leq 0,01$), o teste de Tukey foi utilizado para comparar os valores das médias. Os valores foram representados por regressão, sendo selecionado o modelo mais indicado para cada parâmetro.

2.3 Experimento II - Efeitos da salinidade na germinação, na matéria seca e nos teores de íons inorgânicos

2.3.1 Germinação e determinação da matéria seca ao longo da germinação

As sementes foram postas para germinar em folhas de papel germitest umedecidos com água destilada (controle) ou em solução de NaCl a 100 mM, concentração selecionada previamente no Experimento I. As condições de germinação foram as mesmas mencionadas no item 2.2.1, sendo realizada a contagem de germinação por oito dias após semeadura. Os parâmetros germinativos foram os mesmos avaliados no item 2.2.1. Ao final do teste de germinação, as sementes e plântulas foram coletadas para determinação da matéria seca dos tecidos (endosperma e eixo embrionário), sendo esta obtida após secagem do material vegetal em estufa com circulação forçada de ar a $60 \pm 2^\circ\text{C}$, até obter-se peso constante da matéria seca. Os resultados para esta variável foram expressos em g plântula⁻¹.

2.3.2 Determinação dos teores de íons inorgânicos

Em tubos de ensaio contendo 100 mg da matéria seca do endosperma ou eixo embrionário, foram adicionados 10 mL de água desionizada, sendo os tubos mantidos a 45°C , em banho-maria, durante 1 h, com agitações a cada 15 min. Após esse tempo, os tubos foram

centrifugados a 3.000 x g, por 15 min, a 25°C. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e armazenado a -25°C até sua utilização, sendo o precipitado descartado. Os teores de Na⁺ e K⁺ foram determinados segundo Malavolta, Vitti e Oliveira (1989), com o auxílio de um fotômetro de chama. Os teores de Cl⁻ foram estimados de acordo com Gaines *et al.* (1984), usando-se o reagente Hg(SCN)₂-Fe(NO₃)₃ e através de leituras de absorbância em 460 nm, utilizando-se uma solução de NaCl como padrão. Os teores dos íons inorgânicos foram expressos em µmol g⁻¹ MS (matéria seca) do embrião ou do endosperma.

2.3.3 Delineamento experimental e análise estatística

Para determinação dos parâmetros de germinação foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, correspondendo a dois tratamentos (0 e 100 mM de NaCl), cada um composto por cinco repetições de 20 sementes cada, totalizando 100 sementes por tratamento.

Para as determinações da massa seca dos tecidos e dos teores de íons inorgânicos, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, organizado em um arranjo fatorial [(2 x 8) + 1] composto por dois tratamentos salinos (0 e 100 mM de NaCl) e oito tempos de avaliação (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 DAS), com um tratamento adicional (semente quiescente, SQ - 0 DAS). Os resultados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com dois fatores, para avaliar as diferenças significativas entre eles, usando o teste F de Snedecor's, sendo significativos os valores ($P \leq 0,05$). O teste de Scott-Knott foi realizado para comparar os valores médios, usando o ASSISTAT [version 7.0 beta (The Assistat-Statistical Assistance Software, 2013)]. Os gráficos foram realizados utilizando o Sigma Plot [version 9.0 (SYSTAT Software, Inc.)].

2.4 Experimento III - Caracterização da mobilização das reservas das sementes e de plântulas de pinhão-mansô sob condições de estresse salino

Dez sementes, para cada dose de NaCl e por cada tempo de avaliação, foram germinadas nas mesmas condições experimentais citadas anteriormente, (item 2.2.1), sendo submetidas aos tratamentos 0 (controle) e 100 mM de NaCl. As coletas foram realizadas aos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 DAS, sendo selecionadas cinco sementes (ou plântulas) pela sua

uniformidade, também foram selecionadas cinco sementes quiescentes para essas análises. Desse material, foi coletado o endosperma, que foi armazenado a -20°C , para posterior liofilização e determinação da massa seca. O material liofilizado foi utilizado para a quantificação dos lipídios totais, proteínas totais, açúcares solúveis, aminoácidos solúveis e amido. Sementes e plântulas em diferentes períodos de germinação podem ser observadas na Figura 3.

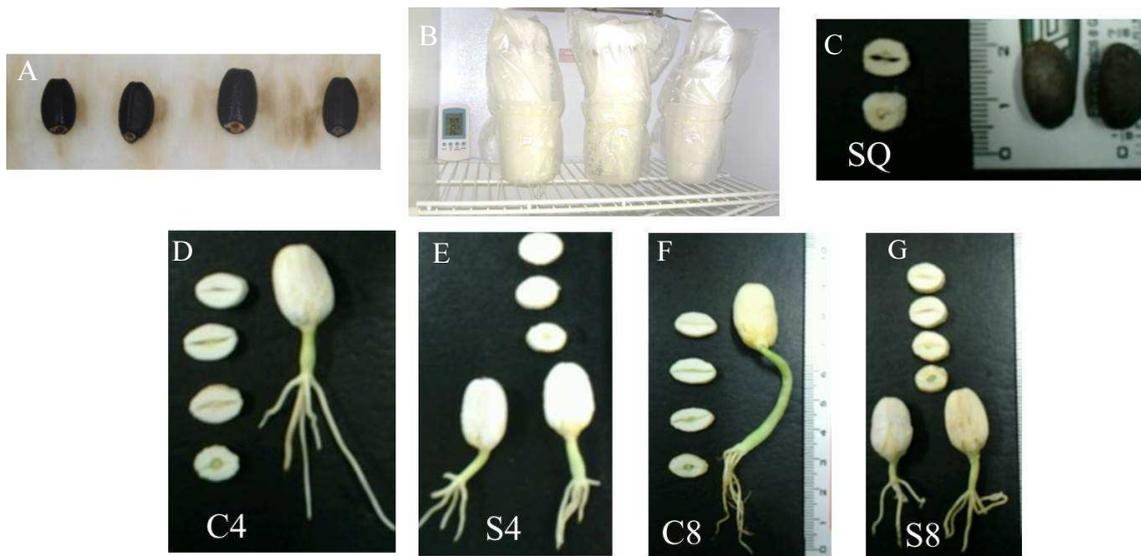


Figura 3. Sementes de pinhão-mansão em diferentes dias de germinação: embebidas em água destilada (A) e postas para germinar em câmara de germinação (B); sementes ou plântulas inteiras ou cortadas transversalmente para as análises nos períodos: SQ, semente quiescente (C), C4 – com quatro dias após a sementeira (DAS) sob condições controle (D); S4 – com 4 DAS sob condições de estresse salino (E); C8 – com 8 DAS sob condições controle (F) e S8 – com 8 DAS sob condições de estresse salino (G).

2.4.1 Reservas das sementes e seus produtos de hidrólise

2.4.1.1 Lipídios totais

Os lipídios totais foram extraídos pela adição de 5 mL de hexano a 200 mg do material liofilizado, em tubos de ensaio previamente tarados, os quais foram submetidos a agitação constante em mesa agitadora (Nova Ética[®], modelo 108/3), através de movimentos orbitais a 45 rpm, durante 30 min. Decorrido esse período, as amostras foram centrifugadas a

10.000 x g, por 10 min, a 25°C. Em seguida, o sobrenadante obtido foi coletado e reservado em tubo de ensaio previamente tarado. Posteriormente, o precipitado remanescente foi extraído novamente com 5 mL de hexano, seguindo o procedimento de extração citado previamente. Ao final, os dois sobrenadantes foram reunidos no mesmo tubo de ensaio, e o precipitado final (delipidado) obtido foi armazenado a 4°C para as análises bioquímicas posteriores. Para as análises dos lipídios, foram obtidos cinco extratos lipídicos, os quais foram quantificados em duplicata, pelo método gravimétrico desenvolvido por Bligh e Dyer (1959), após evaporação da fase orgânica com nitrogênio gasoso. Os lipídios totais foram expressos em mg g^{-1} de MS.

2.4.1.2 Proteínas totais

Os teores de proteínas totais foram determinados no endosperma das sementes de pinhão-mansão, segundo Baethgen e Alley (1989). Utilizaram-se 50 mg de material delipidado (obtido como descrito no item anterior 2.4.1.1), os quais foram postos em tubos digestores contendo 1,11 g da mistura catalisadora [sulfato de potássio (K_2SO_4), sulfato de zinco ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e selênio em pó (Se), na proporção de 1:0,1:0,01 (p/p)], juntamente com 2,0 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Em seguida, os tubos foram colocados em um bloco digestor, no qual a temperatura foi elevada gradualmente até 350°C para que se processasse a mineralização das amostras. Subsequentemente, quando elas já se apresentavam como uma solução de cor verde e sem resíduos de material não-digerido, cada tubo teve seu conteúdo ressuspensão com água desionizada, sendo o volume final aferido para 25 mL, em balão volumétrico. Em tubos de ensaios grandes, foi adicionado 1,0 mL da amostra convenientemente diluída com uma solução preparada pela dissolução de 22 g da mistura catalisadora utilizada na digestão em 1,0 L de H_2SO_4 a 1,1 M (solução diluente). Em seguida, foram adicionados aos tubos, 5,5 mL de uma solução formada por fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 0,1 M, tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) a 5% (p/v) e hidróxido de sódio (NaOH) a 5,4% (p/v); 4,0 mL de uma solução contendo a mistura salicilato de sódio ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$) a 15% (p/v) e nitroprussiato de sódio $\{\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}\}$ a 0,03% (p/v) e 2,0 mL de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,31% (v/v). O branco continha solução diluente ao invés de extrato. Após a adição da solução aos tubos, estes foram agitados, e ao final, mantidos em banho-maria a 37°C durante 15 min. Os teores de nitrogênio total foram estimados através de leituras de absorbância a 650 nm, com base em uma curva padrão ajustada a partir de soluções com concentrações crescentes de

sulfato de amônio. Para cada tratamento, foram obtidos cinco extratos, os quais foram dosados em duplicata. Os teores de proteínas totais foram obtidos através da multiplicação do teor de N total por 6,25, sendo os resultados expressos em mg g^{-1} MS.

2.4.1.3 Amido

A extração e determinação do amido no endosperma de sementes de pinhão-manso foram realizadas como descrito em Hodge e Hofreiter (1962). No precipitado remanescente da extração de carboidratos solúveis totais (ver item 2.4.1.4), foram adicionados 4,0 mL de ácido perclórico (HClO_4) a 30% (v/v), sendo os tubos mantidos sob agitação constante, por 20 min, com o auxílio de uma mesa agitadora [Nova Ética®, modelo 108/3 (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil)], com movimentos orbitais a 45 rpm. Logo após, foram adicionados 3,3 mL de água desionizada em cada um dos tubos, seguido por centrifugação a $3.000 \times g$, por 10 min a 4°C . O sobrenadante foi coletado e o precipitado foi submetido a mais duas extrações, como descrito acima. Ao final das extrações, os sobrenadantes foram reunidos e tiveram seu volume completado para 50 mL com água desionizada em balão volumétrico. Para a determinação do amido, foram adicionados em tubos de ensaio, 0,5 mL do extrato convenientemente diluído e 2,5 mL de uma solução de antrona ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}$) a 0,14% (p/v), preparada em H_2SO_4 a 14 M. Os tubos foram mantidos a 95°C , em banho-maria, por 10 min. Decorrido esse tempo, a reação foi parada pela colocação dos tubos em banho de gelo (aproximadamente 2°C). Após atingirem a temperatura ambiente, as amostras foram submetidas à quantificação dos carboidratos solúveis nelas presentes (devido à hidrólise perclórica do amido) por meio de leituras de absorbância em 620 nm, utilizando-se como branco, água desionizada (em substituição ao extrato) e antrona a 0,14%. A curva padrão de carboidratos foi obtida utilizando-se soluções com concentrações crescentes de D(+) glicose anidra. Para cada tratamento foram obtidos cinco extratos, os quais foram dosados em duplicata e os teores de amido foram expressos em mg g^{-1} MS.

2.4.1.3 Carboidratos solúveis, redutores e não-redutores

Para a determinação dos carboidratos solúveis, ao precipitado remanescente da extração lipídica (item 2.4.1.1), foram adicionados 5 mL de etanol a 80%, sendo essa mistura mantida em banho-maria a 75°C , durante 30 min, com agitações a cada 10 min. Decorrido esse tempo, o material foi centrifugado a $3.000 \times g$, por 15 min, à temperatura ambiente e o

sobrenadante coletado. As extrações foram repetidas por duas vezes, e ao final, os sobrenadantes foram reunidos e armazenados a -25°C , até sua posterior utilização. O precipitado final foi reservado para a extração do amido. Os teores de carboidratos solúveis totais foram determinados de acordo com Dubois *et al.* (1956). Em uma alíquota de 0,5 mL dos extratos etanólicos, convenientemente diluídos, adicionaram-se 0,5 mL de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Para cada tratamento, foram obtidos cinco extratos, os quais foram dosados em duplicata. As amostras foram quantificadas por meio de leituras de absorbância em 490 nm, utilizando-se a D (+) glicose anidra (Sigma) para obtenção da curva-padrão.

Os carboidratos redutores foram Os carboidratos redutores foram determinados de acordo com Somogye (1944) e Nelson (1945) descrito em Hodge e Hofreiter (1962). Em tubos de ensaio contendo 0,5 mL do extrato bruto, convenientemente diluído, foram adicionados 0,5 mL do reativo Nelson AB, composto pela solução de Nelson A (carbonato de sódio anidro a 2,5% (p/v), tartarato de sódio e potássio a 2,5% (p/v), bicarbonato de sódio a 2,0% (p/v) e sulfato de sódio anidro a 20% (p/v) em água desionizada) e solução de Nelson B (sulfato de cobre pentaidratado a 15% (p/v) em ácido sulfúrico concentrado a 0,01% (v/v) em água desionizada) na proporção de 4:1 (v/v). Em seguida, os tubos foram hermeticamente fechados, agitados e mantidos em banho-maria a 100°C , durante 20 min. Transcorrido esse tempo, a reação foi cessada colocando-se os tubos em banho de gelo (aproximadamente 2°C). Após resfriamento, foram adicionados 0,5 mL da solução arsenitomolibídica (molibdato de amônio tetraidratado a 5% (p/v), ácido sulfúrico concentrado a 4,2% (v/v) e arsenito de sódio heptaidratado a 0,6% (p/v) em água desionizada) e os tubos foram agitados vigorosamente por aproximadamente 2 min. Em seguida, foram adicionados 3,5 mL de água desionizada, sendo os tubos agitados. Após esse procedimento, as amostras foram submetidas à quantificação dos carboidratos redutores por meio de leituras de absorbância em 540 nm, utilizando-se como branco, etanol a 80% (em substituição ao extrato) e os demais componentes do meio de reação. A curva padrão de carboidratos redutores foi obtida utilizando-se soluções com concentrações crescentes de D(+) glicose anidra. Para cada tratamento, foram obtidos cinco extratos, sendo cada um dosado em duplicata. Os carboidratos não-redutores foram determinados pela diferença entre os carboidratos solúveis totais e os redutores. Os teores de carboidratos solúveis foram expressos em mg g^{-1} MS.

2.4.1.5 Aminoácidos solúveis

Os aminoácidos solúveis foram determinados pelo método de Yemm e Cocking (1955), usando o mesmo extrato utilizado na determinação de carboidratos solúveis. Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL do extrato etanólico, convenientemente diluído; 0,25 mL de tampão citrato a 0,2 M, pH 5,0; 0,5 mL de cianeto de potássio (KCN) a 0,2 mM, em metilcelosolve ($C_3H_8O_2$) a 100% (v/v); e 0,1 mL de ninhidrina a 5% (p/v), em metilcelosolve a 100% (v/v). Em seguida, os tubos foram fechados, agitados e mantidos a 95°C, em banho-maria, durante 20 min. A reação foi interrompida abruptamente colocando-se os tubos em banho de gelo (2°C), nos quais foram adicionados 0,65 mL de etanol a 60% (v/v). Os teores de aminoácidos livres foram estimados através de leituras de absorvância em 570 nm, tomando-se como branco que correspondeu a água desionizada (em substituição ao extrato) e os demais constituintes do meio de reação. A curva padrão foi ajustada a partir de soluções com concentrações crescentes de glicina. Para cada tratamento, foram obtidos cinco extratos, os quais foram dosados em duplicata e os teores de aminoácidos livres foram expressos em $mg\ g^{-1}\ MS$.

2.4.2 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, organizado em um arranjo fatorial [(2 x 8) + 1] composto por dois tratamentos: duas soluções (0 e 100 mM de NaCl) e oito períodos de avaliação (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 DAS), com um tratamento adicional (semente quiescente, SQ – 0 DAS). Cada tratamento foi composto por cinco repetições, formadas de endospermas de sementes ou plântulas uniformes. Os resultados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com dois fatores, para avaliar as diferenças significativas entre eles, usando o teste F de Snedecor's, sendo significativos os valores ($P \leq 0,05$). O teste de Scott-Knott test foi realizado para comparar os valores médios, usando o ASSISTAT [version 7.0 beta (The Assistat-Statistical Assistance Software, 2013)]. Os gráficos foram feitos utilizando o Sigma Plot [version 9.0 (SYSTAT Software, Inc.)].

2.4.3 Análises por microscopia

2.4.3.1 Análises citoquímicas

Para as análises citoquímicas, seções transversais do endosperma de três sementes submetidas aos tratamentos controle (água destilada) e salino (100 mM de NaCl), foram coletadas aos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 DAS. As seções dos endospermas foram fixadas em solução contendo a mistura de paraformaldeído a 4% (p/v) e glutaraldeído a 1% (v/v) preparada em tampão fosfato de sódio a 0,2 M, pH 7,2, por 24 h, sendo esse procedimento realizado a 4°C (KARNOVSKY, 1965). Após a finalização do tempo de fixação, o material foi exposto a três lavagens de 10 min cada, com tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 e, logo em seguida, a três rápidas lavagens em água destilada. Após esse procedimento, realizou-se a desidratação do material em bateria crescente de etanol, sendo o material posteriormente exposto a pré-infiltração em resina-álcool etílico na proporção 1:1 (v/v) por 24 h. Ao final da pré-infiltração, o material foi incluído em resina pura (Historesin Embedding Kit – Jung) e com a obtenção dos blocos, foram feitos cortes seriados de 5 µm, usando um micrótomo automático (Leica RM 2065).

Os cortes foram submetidos aos seguintes corantes citoquímicos: azul de toluidina (AT) a 0,025%, pH 4,0, que detecta radicais aniônicos da parede celular (VIDAL, 1977); xylydine Ponceau (XP) a 0,1%, pH 2,5, para detectar proteínas (VIDAL, 1970); a reação do PAS (periodic acid-schiff), para detecção de polissacarídeos da parede celular (MAIA, 1979); e o reagente lugol para detecção de amido (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

Para detecção dos corpos lipídicos, parte do material não incluído em resina foi mantido em álcool etílico a 70% até a realização de cortes à mão livre, os quais foram corados com o reagente Sudan IV e descorados em álcool etílico a 90%, de acordo com método proposto por Gerlach (1984), para posterior análise por microscopia óptica.

2.4.3.2 Microscopia confocal

Para as análises de microscopia confocal, foram utilizadas lâminas com cortes semifinos processados em resina, sem a exposição a corantes, obtidos como descrito no item 2.4.3.1. Esses cortes foram obtidos de endospermas coletados aos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 DAS em condições controle (água destilada) e de estresse salino (100 mM de NaCl). Utilizou-se o corante Nilo Red, que foi dissolvido em acetona a 100% para a obtenção de uma solução

estoque correspondendo a 50% (p/v). Posteriormente, realizaram-se diluições dessa solução estoque em glicerol a 75%, até que a sua concentração final fosse de 0,2%, da qual foi retirada uma gota para cobrir os cortes em resina (ALTAN *et al.*, 2011). Após 5 min de exposição ao corante Nilo Red diluído, acrescentou-se uma gota de glicerol para montar a lamínula sobre a lâmina. Ao final, observou-se a fluorescência do material usando um microscópio confocal a laser (Carl Zeiss LSM 710- T-PMT) com filtro de excitação a 514 nm, e um filtro de barreira entre 620 e 630 nm.

2.4.3.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Para as análises de microscopia eletrônica de transmissão, as sementes foram semeadas em papel germitest umedecidos com água destilada (condições controle) e solução salina (100 mM de NaCl). Posteriormente, as sementes foram coletadas aos 0, 4 e 8 DAS, e dessas sementes foram obtidos os endospermas, os quais foram cortados transversalmente. As secções dos endospermas foram fixadas em solução contendo glutaraldeído a 2,5% (v/v) e paraformaldeído a 2% (p/v) preparadas em tampão cacodilato a 50 mM, pH 6,8, contendo CaCl_2 a 5 mM e sacarose a 0,1 M. Esse material foi fixado por 48 h a 25°C em temperatura ambiente, e posteriormente lavado por 3 vezes com o tampão cacodilato a 50 mM contendo sacarose, em intervalos de 2 h para cada lavagem. Logo após, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão utilizado para a lavagem citada anteriormente.

Após a pós-fixação, o material foi lavado no mesmo tampão sem ósmio, e mantido nessa solução até o seu uso. Em sequência, o material foi desidratado em série crescente de etanol (50-100%), por 15 min cada, e subsequentemente, exposto a soluções de álcool-acetona (1:1), acetona pura, ambas com duração de 15 min cada. Logo em seguida, esse material foi embebido em resina epon dissolvida em acetona, durante 12 h, em temperatura ambiente a 25°C. Decorrido esse tempo, o material foi incluído em resina Epon pura e a polimerização ocorreu em estufa a 60°C, por 48 h.

Os cortes semifinos (1-2 μm) foram obtidos utilizando-se um ultramicrotomo LKB equipado com navalhas de vidro. Esses foram transferidos para lâminas e corados com solução de azul de toluidina, para que fossem observados por microscopia de luz. Concluída essa observação, obtiveram-se os cortes ultrafinos (~ 90 nm) com o uso de navalhas de diamante, os quais foram coletados em telas de cobre para a exposição à solução de contraste (solução aquosa de acetato de uranila a 2% em álcool) (WATSON, 1958), por 15 min, na ausência da luz. Logo em seguida, o material foi rapidamente lavado com água destilada e

exposto a citrato de chumbo a 0,2% durante 10 min. Ao final da preparação dos cortes, estes foram observados no microscópio eletrônico de transmissão do Laboratório de Microscopia eletrônica da Universidade de Campinas (Zeiss, Leo 906), operando a uma velocidade de excitação dos elétrons de 80 kv.

2.4.4 Determinação dos ácidos graxos

2.4.4.1 Obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos

Os ácidos graxos foram determinados no endosperma das sementes de pinhão-manso coletados aos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 DAS obtidos nas mesmas condições de germinação apresentadas anteriormente no item 2.2.1. Para obtenção dos ácidos graxos na forma livre, os extratos contendo os lipídios totais obtidos da extração com hexano (item 2.4.1.1) foram reunidos e submetidos à saponificação. Para isso, foram utilizadas aproximadamente 0,4 g dos extratos lipídicos remanescentes, aos quais foram adicionados 0,4 g de hidróxido de potássio (KOH) e 3 mL de metanol absoluto. A mistura reacional foi realizada em balão volumétrico de 25 mL acoplado a um destilador, sendo deixada sob um sistema de refluxo por 1 h para que a reação de saponificação ocorresse. Após a evaporação do solvente, acrescentaram-se 10 mL de água destilada até a completa dissolução do resíduo. Em seguida, essa solução contendo os sais de ácidos graxos foi transferida para funil de separação, ao qual foram adicionados 10 mL de hexano, por duas vezes, para separação da fase aquosa. Posteriormente, foram adicionadas à fase aquosa, gotas de HCl a 20% até que o pH da fase ficasse em torno de 5-6. Em sequência, transferiu-se a fase aquosa para um funil de separação, adicionando-se 5 ml de acetato de etila por duas vezes. A fase orgânica foi separada, concentrada em rotoevaporador, sendo então transferida para frasco de vidro e mantido em banho-maria a 60°C para total remoção do solvente.

A fase orgânica obtida como descrito acima, foi submetida ao processo de metilação, que foi realizado através da adição de 5 mL de metanol absoluto e 1 mL de HCl concentrado. Posteriormente, o produto metilado foi mantido em sistema de refluxo por 1 h para sua concentração e ao final foi deixado em banho-maria a 60°C, para a completa retirada do solvente.

2.4.4.2 Quantificação dos ésteres metílicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados e identificados pelo sistema GC/MS (gas chromatography/mass spectrometry), em cromatógrafo gasoso (Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 plus), acoplado a um detector seletivo de massas. As condições de operação da análise cromatográfica foram: temperatura inicial do forno de 80°C, por 2 min; em seguida, incrementada a 180°C, a uma razão de 10°C/min e mantida por 3 min; e por fim, incrementada a uma razão de 5°C/min até atingir 250°C e mantida por 7 min, sendo o tempo total de corrida de 36 min. As temperaturas do injetor, da interface e da fonte de íons do espectrômetro de massas foram de 280°C. O modo de injeção foi do tipo Split, utilizando o hélio como gás de arraste, com velocidade linear de 1,20 mL/min.

Os ácidos graxos foram separados em coluna capilar RTX-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e, em seguida, identificados e quantificados por meio de comparação com os tempos de retenção e espectro de massas de uma mistura de padrões de ésteres metílicos (F.A.M.E. Mix C8-C24, Supelco Analytical®). Cada extrato foi dosado em triplicata, e os valores obtidos foram expressos em µmol g⁻¹ MS.

2.5 Experimento IV - Avaliação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídios durante a germinação das sementes e desenvolvimento das plântulas de pinhão-manso submetidas ao estresse salino

2.5.1 Coleta do material para as análises enzimáticas e expressão gênica

As condições de germinação e os tratamentos foram os mesmos descritos anteriormente (item 2.1.1), sendo utilizados os endospermas das sementes de pinhão-manso com 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas após a semeadura (HAS). O material coletado (matéria fresca) foi pulverizado com N₂ líquido e armazenado em freezer a -80°C, até posterior utilização.

2.5.2 Extratos enzimáticos

Os extratos enzimáticos foram preparados, utilizando-se 100 mg de pó liofilizado, aos quais foram adicionados 2 mL de tampão de homogeneização Tris-HCl a 100 mM a pH 7,5, contendo também: KCl a 10 mM, MgSO₄ a 1 mM, EDTA a 1 mM, glicerol a 20% (v/v), ditioneitol (DTT) a 2 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) a 1 mM, 2-mercaptoetanol a 0,1% (v/v) e PVPP (polivinilpolipirrolidona) a 0,6% (p/v). de endospermas de sementes de pinhão-manso. A extração foi realizada a 4°C, mantendo o almofariz e o pistilo em isopor com gelo. Após o período de extração, as amostras foram filtradas em tecido de nylon e centrifugadas a 10.000 x g, por 30 min, a 4°C. Decorrido esse tempo, o sobrenadante obtido foi utilizado para os ensaios enzimáticos e dosagem de proteínas solúveis totais. Aos extratos destinados para a determinação da atividade lipásica não foram adicionados PMSF e 2-mercaptoetanol.

2.5.3 Lipase (E.C. 3.1.1.1)

A atividade lipásica foi determinada de acordo com o método de Winkler e Stuckmann (1979), com modificações introduzidas por Gupta, Rathi e Gupta (2002). O meio de reação foi composto por 0,1 mL do extrato bruto e 2,4 mL de uma mistura recém-preparada das seguintes soluções na proporção 1:9, respectivamente: i) solução tampão Tris-HCl a 55 mM, pH 8,0, contendo goma arábica a 0,11% (p/v) e desoxicolato de sódio a 0,23% (p/v); ii) solução de palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) a 0,3% (p/v) preparado em isopropanol a 100%(v/v). A reação foi iniciada pela adição do extrato bruto e as amostras foram incubadas a 37°C, em banho-maria, durante 15 min. Em seguida, a liberação dos ânions de nitrofenol foi monitorada a 410 nm, dentro do intervalo de 2-5 min do início da reação. Para a análise enzimática foram obtidos cinco extratos para cada tratamento e período avaliado. Cada extrato foi dosado em duplicata e foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ relacionado ao *p*-nitrofenol para a determinação da atividade enzimática da lipase. Esta atividade foi expressa em $\mu\text{mol de } p\text{-nitrofenol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot.}$

2.5.4 Liase do isocitrato (E.C. 4.1.3.1)

A atividade da liase do isocitrato foi determinada segundo o método de Dixon e Kornberg (1959). A mistura de reação com um volume final de 1,2 mL, consistiu de tampão Tris-HCl a 50 mM (pH 8,0), MgSO₄ a 5 mM, 2-mercapetoetanol a 50 mM, cloridrato de fenilhidrazina (C₆H₈N₂.HCl) a 20 mM, cloridrato de cisteína (C₃H₇NO₂S.HCl) a 2 mM, isocitrato de sódio a 1,67 mM e 100 µL do extrato. A reação foi iniciada pela adição do isocitrato de sódio, e ocorreu a uma temperatura de 25°C. Foram feitas duas leituras a 324 nm, sendo uma aos 15 s e a outra aos 5 min e 15 s. Para a análise enzimática foram obtidos cinco extratos para cada tratamento e período avaliado. Cada extrato foi dosado em duplicata e a atividade enzimática foi expressa em nmol glioxilato min⁻¹ mg⁻¹ Prot, assumindo um coeficiente de extinção molar de 1,7 x 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹ para o glioxilato de fenilhidrazona (DIXON; KORNBERG, 1959).

2.5.5 Sintase do malato (E.C. 2.3.3.9)

A atividade da sintase do malato (SM) foi determinada medindo-se o aumento da absorvância em 412 nm, devido à reação entre o DTNB (ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-dibenzóico) e o grupo tiol da coenzima-A (CoA), de acordo com o método descrito por Hock e Beevers (1966). O meio de reação foi composto por tampão imidazol-HCl a 100 mM, pH 7,1, MgCl₂ a 5 mM, DTNB a 0,13 mM, acetil-CoA a 0,1 mM, glioxilato de sódio (C₂HO₃Na.H₂O) a 3,33 mM e 100 µL do extrato bruto, em um volume final de 10,0 mL. A reação foi iniciada pela adição do glioxilato de sódio a 25°C, sendo realizadas leituras de absorvância em 412 nm aos 15 s e 2 min e 15 s de reação, respectivamente. Cada extrato foi dosado em duplicata e a atividade enzimática foi expressa em nmol de CoA min⁻¹ mg⁻¹ Prot, sendo usado o coeficiente de extinção molar do complexo DTNB-CoA (1,33 x 10⁷ M⁻¹ cm⁻¹).

2.5.6 Concentração de proteína

A concentração de proteínas solúveis nos extratos enzimáticos foi determinada de acordo com Bradford (1976). Em tubos de ensaio, foram adicionados 100 µL do extrato convenientemente diluído, seguido pela adição de 1,0 mL do reagente composto por azul de

coomassie brilhante G-250 a 0,01% (p/v), etanol a 4,75% (v/v) e ácido fosfórico (H₃PO₄) a 8,5%. Após 15 min, a concentração de proteínas solúveis foi estimada pela leitura de absorbância em 595 nm, tomando-se como branco, água desionizada (em substituição ao extrato) e o reagente. A curva padrão foi obtida utilizando-se soluções com concentrações crescentes de albumina séria bovina (BSA). Cada extrato foi dosado em duplicata e a concentração de proteína obtida foi utilizada para os cálculos de atividade enzimática específica.

2.5.7 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, organizado em um arranjo fatorial [(2 x 10) + 1] composto por dois tratamentos: duas soluções (0 e 100 mM de NaCl) e dez períodos de avaliação (0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 HAS), com um tratamento adicional (semente quiescente, SQ - 0 HAE). Cada tratamento foi composto por cinco repetições, contendo endospermas de sementes ou plântulas uniformes. Os resultados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) com dois fatores, para avaliar as diferenças significativas entre eles, usando o teste F de Snedecor's, sendo significativos os valores ($P \leq 0,05$). O teste de Scott-Knott foi realizado para comparar os valores médios, usando o ASSISTAT [version 7.0 beta (The Assistat-Statistical Assistance Software, 2013)]. Os gráficos foram feitos utilizando o Sigma Plot [version 9.0 (SYSTAT Software, Inc.)].

2.5.8 Análise da expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídios

O RNA total foi extraído de endospermas de sementes e plântulas com 0, 12, 24, 72, 96, 144 e 168 HAS submetidas aos tratamentos de NaCl a 0 e 100 mM. A expressão gênica foi avaliada através de RT-qPCR (PCR em tempo real). Os genes alvo analisados foram os das enzimas liase do isocitrato, sintase do malato e lipase do triacilglicerol I e II. Vários genes constitutivos (Actina11, EF1 α , PPA2 α e GADPH) foram testados, onde o PPA2 α apresentou a expressão mais estável e foi então usado como referência na normalização dos dados de expressão.

2.5.8.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) testados como constitutivos (Actin11, EF1 α , PPA2 α e GADPH) foram desenhados por Rocha *et al.* (2013), enquanto que os genes da lipase do triacilglicerol I e II foram elaborados por Cunha (2011). No presente estudo, foram desenhados os primers para os genes da liase do isocitrato e sintase do malato nas junções éxons-éxons, usando o programa *Perl primer v.1.1.20* (Marshal, 2004). As sequências dos primers testados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de genes de interesse e constitutivos mostrando as sequências dos respectivos *primers*

Abreviaturas	Produto gênico	Sequência de primers	Amplicons (pb)
ACT11	Actin11	F-CTAAAGGCTAATGGGGAAAC R-CAACCACTTGATTAGAAGCC	68
EF1- α	Fator de alongamento alfa	F-TGCTGTGCTCATTATTGAC R-GCATCCATCTTGTTGCAG	95
GADPH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase 2	F-TGGTTGATCTCACTGTTAGG R-AGACTCCTCTTTGATCGCAG	73
PPA2 α	Fosfatase protéica 2A2	F-AATATGGAAATGCCAACGTC R-GTAAGCAGAAGACCTGACTC	92
Sequência dos primers dos genes alvo			
TAG1	Triacilglicerol lipase I	F- GAAACACATTTGGGAAATCG R- GTATTCATTCCAGCAGTCGT	146 pb
TAG2	Triacilglicerol lipase II	F-ATAGCATTGGCATCTTTCTC R-ATAGTGTAGTGACCTCACCA	147 pb
ISO	Liase do isocitrato	F-ACTCTTGCTCATCAGAAATGGT R-TCCTCAGTCACTCCTTTGCC	68 pb
MAL	Sintase do malato	F-CAAGACATTCCAGGCTCACC R- AATTTGTGCTGCCATGCCA	70 pb

*Foram utilizados pares de primers F (forward) e R (Reverse)

2.5.8.2 Extração do RNA Total

O RNA total foi extraído de endospermas de sementes com sementes e plântulas com 0, 12, 24, 72, 96, 144 e 168 HAS submetidas aos tratamentos de NaCl a 0 e 100 mM. Foram utilizados aproximadamente 200 mg de endosperma macerados com N₂ líquido, com auxílio de almofariz e pistilo. Esse macerado foi destinado para a extração do RNA total com o reagente *Plant RNA purification reagent* (Invitrogen) e, em seguida, foi realizada a segunda etapa de extração com a utilização do *RNeasy plant mini Kit* (Qiagen), sendo ambas as extrações feitas seguindo as instruções dos fabricantes e descritas a seguir.

Ao macerado foram adicionados 750 µL do kit *Plant RNA purification reagent* (Invitrogen), sendo a mistura homogeneizada por 30 s com auxílio de vórtex e, em seguida, centrifugada a 12.000 x g por 3 min. Ao sobrenadante obtido, foram adicionados 150 µL de NaCl pré-tratado com DEPC (dietilpirocarbonato) e, logo em seguida, 450 µL de clorofórmio, sendo a mistura centrifugada a 12.000 x g por 10 min, a 4°C. Posteriormente, coletou-se a fase aquosa, e a esta foram adicionadas 550 µL de álcool isopropílico, sendo essa mistura centrifugada a 12.000 x g por 10 min, a 4°C.

Após a etapa inicial de extração, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspenso com 50 µL de água livre de RNase. Às amostras obtidas, foram adicionados 700 µL do tampão de lise RLT e 10 µL de β-mercaptoetanol, sendo a mistura homogeneizada com auxílio de vórtex. A solução obtida foi transferida para uma mini coluna do kit da Qiagen (QIAshedder spin column - lilás, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e centrifugada a 25°C por 2 min a 15.000 x g.

A solução obtida previamente (aproximadamente 700 µL) foi transferida para tubo eppendorf e a este foram adicionados 400 µL de etanol. Em seguida, transferiu-se uma alíquota de 600 µL da mistura anterior para uma nova coluna do kit (RNeasy mini spin column – rósea, acoplada a um tubo coletor de 2 mL), e realizou-se centrifugação a 10.000 x g, por 20 segundos, a 25°C. Após essa etapa, foram adicionados 700 µL do tampão RW1 à coluna rósea, e realizou-se centrifugação a 25 °C, por 20 s, a 10.000 x g. Após esse procedimento, a coluna rósea foi transferida para um novo tubo coletor, ao qual foram adicionados 500 µL de tampão RPE, e logo em seguida, realizou-se centrifugação a 10.000 x g, a 25°C, por 20 s. O mesmo volume do tampão RPE mencionado foi adicionado, sendo desta vez, os tubos centrifugados a 10.000 g por 2 min. Logo em seguida, o tubo coletor foi trocado e foi realizada nova centrifugação a 13.000 g por 1 min. Posteriormente, a solução obtida foi descartada, e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 1,5 mL, ao qual

foram adicionados 50 μL de água livre de RNase diretamente na coluna. Esta solução foi submetida à nova centrifugação a $10.000 \times g$, a 25°C , por 1 min, sendo esse passo repetido uma vez. Ao final, foram obtidas as amostras de RNA, que foram armazenadas a -20°C para posterior quantificação, análises eletroforéticas, reações de transcrição reversa (TR) e ensaios de RT- qPCR.

2.5.8.3 *Quantificação e pureza do RNA Total*

Para a quantificação do RNA total, utilizou-se alíquotas de 1 μL que foram quantificadas comprimento de onda de 260 nm (A_{260}) usando o aparelho Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Para a identificação de contaminação com proteínas, foi estimada a razão das leituras de absorbância A_{260}/A_{280} , onde valores superiores a 1,8 indicam que não há contaminação por proteínas. Já para a detecção de contaminação com polissacarídeos foi estimada a razão das leituras de absorbâncias A_{260}/A_{230} , sendo que valores superiores a dois indicam que não há esse tipo de contaminação.

2.5.8.4 *Integridade do RNA total*

A análise da integridade do RNA total foi realizada através de eletroforese unidimensional em gel de agarose a 1,0%, usando 0,5 μg de RNA. O tampão de corrida utilizado foi o MOPS [(ácido 3-(morfilino-propanossulfônico)], e a cuba eletroforética foi mantida a uma corrente elétrica constante de 35 mA. Após a corrida, o gel de agarose foi corado com solução de brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), por 10 minutos. Para visualização das bandas de RNA ribossomal (18S e 28S), o gel de agarose foi exposto a um transiluminador de luz UV, e fotodocumentado por meio do sistema Mini BIS Pro (Bio-Imaging Systems) com auxílio do software Gel Capture™.

2.5.8.5 *Síntese de DNA complementar (cDNA)*

Para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizou-se o kit da *IMpromIITM Transcriptase Reverse* (Promega, Estados Unidos), conforme as recomendações do fabricante. Para a reação foram utilizados 1 μg de RNA total, 1 μL oligodT24 a 20 nM, 2,4 μL MgCl_2 a 25 mM, 3 μL de dNTPs a 10 mM e 4 μL de tampão de reação 5X (*ImProm-IITM Reaction Buffer*, Promega®) e água livre de RNase (Qiagen). A solução obtida foi incubada a 65°C

por 1 min, e imediatamente transferida para banho de gelo. Posteriormente, 1 μL da enzima transcriptase reversa a $160 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ foi adicionada em cada tubo de reação, sendo o volume completado para 20 μL . Ao final, a mistura de reação foi deixada a 42°C por 1 h, e em seguida a 75°C , por 15 min, o que ocorreu em termociclador. O cDNA obtido foi diluído a $25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e armazenado a -20°C para as posteriores reações de qPCR.

2.5.8.6 PCR semi-quantitativa

A reação de PCR semi-quantitativa foi realizada para testar a qualidade do cDNA, produzido como descrito no item anterior. Utilizou-se para essa reação o par de *primers* referente ao gene da actina. Para cada reação, foi utilizado 1 μL de cDNA a $25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, acrescido de tampão de reação 5x, 1 μL de dNTPs (5 mM), 1 μL de cada primer a 300 nM, 0,1 μL da enzima GoTaqDNA polimerase (Promega®) a $5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. O volume total foi completado com água livre de RNase, totalizando 25 μL . O resultado da amplificação foi visualizado em gel de agarose 2%.

2.5.8.7 RT – qPCR

Para determinar a temperatura de anelamento ótima para cada par de primers, que é uma etapa inicial das reações de PCR quantitativa em tempo real (RT – qPCR), as amostras de cDNA foram submetidas a um gradiente de temperatura no termociclador Mastercycler ep realplex 4S (Eppendorf®). Nesse procedimento, foi usado um “pool” de amostras de cDNA (de todas as condições analisadas) e as seguintes temperaturas foram testadas: 47,2; 48,8; 50,5; 52,7; 55; 57,5; 61,9 e 65°C . As temperaturas de anelamento selecionadas para cada par de primers se encontram na Tabela 2.

Tabela 2. Temperatura de anelamento selecionada para os genes testados como constitutivos e genes alvos

Genes	Actin11	EF1a	GADPH	PPA2a	TAG1	TAG2	ISO	MAL
Temperaturas de anelamento selecionadas	48,8°C	52,7°C	47,2°C	47,2°C	59,8°C	55,0°C	61,9°C	47,2°C

As reações de qPCR foram realizadas de acordo com o seguinte protocolo: para cada reação (poço da placa) foram adicionados 10 μL do reagente *Power SYBR Green PCR Master Mix 2X* (Applied Biosystems), 4 μL de cDNA (100 ng μL^{-1}), 1 μL de cada oligonucleotídeo iniciador (senso e anti-senso) em uma concentração de 300 ng μL^{-1} , e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada e livre de nucleases, totalizando 20 μL de reação. O monitoramento em tempo real da PCR foi realizado em um termociclador *Mastercycler ep realplex 4S* (Eppendorf®) através da detecção dos níveis de fluorescência do SYBR Green. Os dados de fluorescência foram monitorados/coletados através do Realplex Software.

As reações ocorreram em placas com 96 poços, sendo realizadas em triplicata, e conduzidas de acordo com os seguintes parâmetros: 1) 95°C, por 10 min; 2) 40 ciclos: 15 s de desnaturação a 95°C, 15 s de anelamento, variando a temperatura de acordo com cada par de *primer*; e por fim 20 s de extensão a 60°C. Também foi feita a curva de dissociação (*Melting*), que consistiu de 15 s de incubação a 95°C, 15 s de incubação a 60°C e uma subida a 95°C por 15 s (SARAIVA *et al.*, 2013).

2.5.8.8 Análise dos dados de expressão por RT-qPCR

Após a realização das reações de PCR em tempo real, os níveis de expressão gênica foram determinados pelo número de ciclos de amplificação necessários para a fluorescência (emitida pelo SYBR Green) ultrapassar um limiar durante a fase exponencial da reação de PCR, determinado pelo Ct (*Cycle threshold*). Os Cts utilizados para as análises foram obtidos através da média aritmética entre as triplicatas de reações para cada condição e gene. Para normalização dos resultados, foi utilizada a equação $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{gene alvo}) - \text{Ct}(\text{controle endógeno})$. Os valores brutos de Ct foram convertidos em dados de expressão relativa utilizando-se o método delta Ct e delta-delta Ct (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) com o auxílio do programa GeNorm (VAMDESOMPELE *et al.*, 2002).

3 RESULTADOS

3.1 Experimento I - Avaliação da germinação de sementes de pinhão-manso submetidas a diferentes concentrações de NaCl

3.1.1 Parâmetros germinativos

A percentagem de germinação (%G), o índice de velocidade de germinação (IVG) e o tempo médio de germinação (TMG) em função do tratamento com NaCl em diferentes concentrações podem ser observados na Figura 4. O percentual de germinação foi reduzido em 8, 39, e 88% para os tratamentos a 50, 100 e 150 mM de NaCl, respectivamente, quando comparados ao tratamento controle (água destilada) (Figura 4A). Esse parâmetro apresentou o comportamento de uma regressão quadrática, onde foi evidente a redução de seus valores em função do aumento da concentração de NaCl.

Os parâmetro IVG também apresentou a tendência a um modelo quadrático de regressão, sendo observadas reduções de 5, 48 e 92% nos tratamentos de 50, 100 e 150 mM de NaCl, respectivamente, em comparação ao tratamento controle (Figura 4B). O TMG foi o único parâmetro germinativo que foi praticamente inalterado, levando em consideração que para os tratamentos de NaCl a 0 e 50 mM, este foi de 8 dias, enquanto que para os outros tratamentos salinos este tempo foi de 9 dias (Figura 4C). Também se verificou que a germinação se iniciou a partir do 4º dia após a semeadura (DAS), e que praticamente todas as sementes haviam germinado aos 8 DAS, não sendo verificadas muitas diferenças depois desse período (resultados não apresentados).

Após a realização desse experimento, selecionou-se a dose de 100 mM de NaCl para ser utilizada nos experimentos posteriores, por ser a dose a partir da qual a germinação foi substancialmente reduzida (em 40%), quando comparado àquela sob condições controle. A dose de sal de 150 mM de NaCl não foi utilizada porque a %G foi muito baixa, apenas 11% em relação àquela do controle.

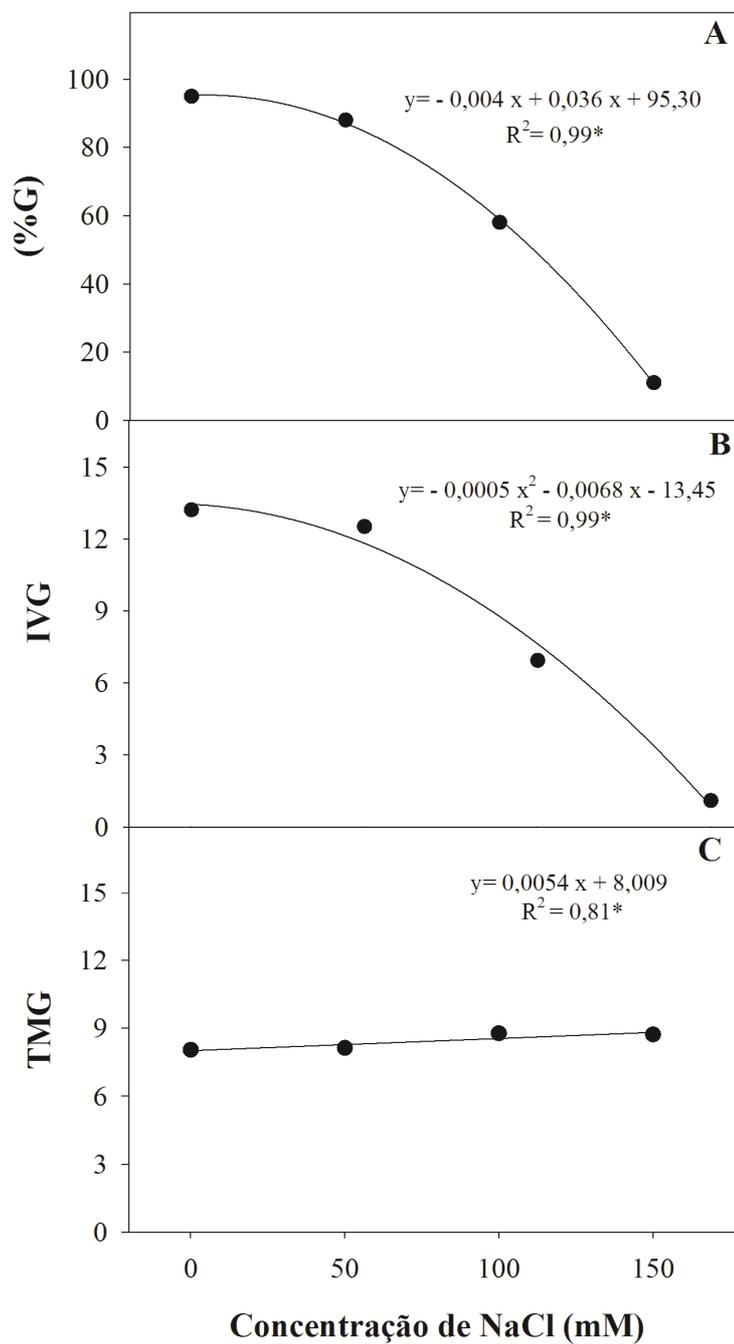


Figura 4. Percentagem de germinação (%G, A), índice de velocidade de germinação (IVG, B) e tempo médio de germinação (TMG, C) de sementes de pinhão-mansó submetidas a doses crescentes de NaCl. As observações foram feitas durante doze dias. Os valores representam a média de cinco repetições \pm erro padrão da média.

3.2 Experimento II – Efeitos da salinidade na germinação, na matéria seca e nos teores de íons inorgânicos

3.2.1 Determinação da matéria seca ao longo da germinação

Tanto sob condições controle como de estresse salino (NaCl a 0,1 M), a matéria seca do eixo embrionário (MSEE) aumentou ao longo da germinação (Figura 5A). No entanto, a partir do 5^o DAS os valores de MSEE foram mais elevados sob condições controle, atingindo no último dia do período estudado (8 DAS) um valor 157% superior àquele do tratamento salino (Figura 5A).

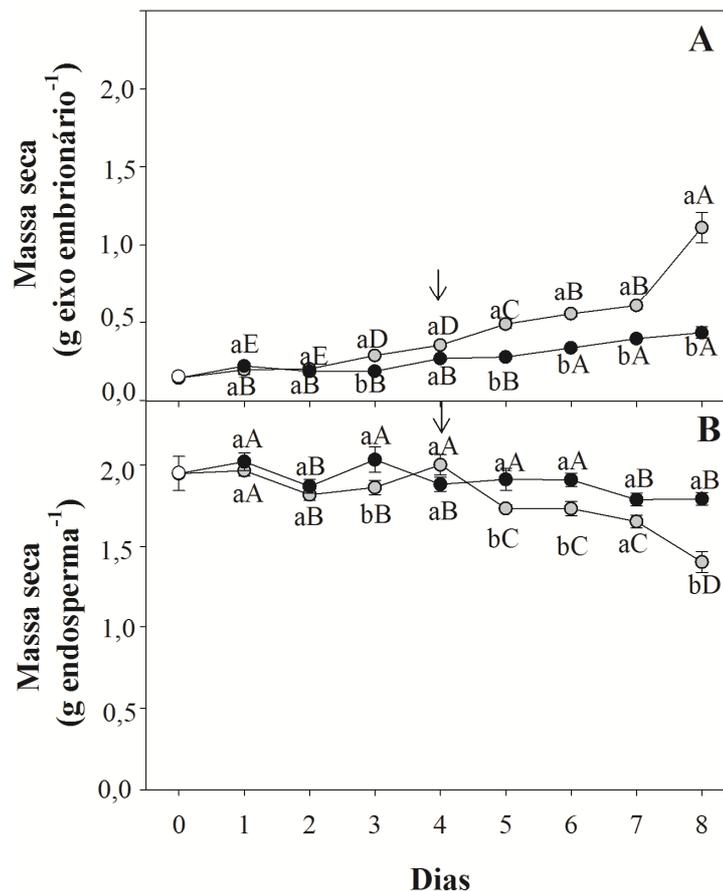


Figura 5. Massas secas do eixo embrionário (A) e do endosperma (B) de sementes de pinhão-mansão durante a germinação e estabelecimento da plântula, sob condições controle (○) e de estresse salino (●). Os valores na semente quiescente são apresentados como referência (○). Valores com mesmas letras minúsculas, dentro dos tratamentos, ou com mesmas letras maiúsculas nos tempos avaliados, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média e a seta indica o dia da protrusão da radícula.

Por outro lado, a MSE de sementes do tratamento salino permaneceu praticamente constante ao longo da germinação, enquanto aquela do controle decresceu significativamente a partir do 5^o DAS, atingindo aos 8 DAS um valor 22,7% menor que aquele do tratamento salino (Figura 5B).

3.2.2 Teores de íons inorgânicos no endosperma e eixo embrionário durante a germinação

Os teores do íon sódio (Na^+) no eixo embrionário, proveniente de sementes sob condições controle, apresentaram alterações significativas durante a germinação (Figura 6A). Já em condições de estresse salino, nesses mesmos órgãos, os teores de sódio apresentaram grande aumento, atingindo, no 7^o DAS, valor quatro vezes aquele observado na semente quiescente e três vezes aquele sob condições controle. No endosperma, sob condições controle, os teores de Na^+ apresentaram pequeno aumento durante a germinação, enquanto que sob condições salinas eles apresentaram grande aumento e foram, a partir do 2^o DAS, sempre superiores àqueles do controle (Figura 6B). Nesse mesmo tratamento, aos 8 DAS, os teores desse íon foram seis vezes aquele observado para a semente quiescente e cerca de duas vezes aquele do endosperma proveniente de sementes sob condições controle.

Os teores de Cl^- no eixo embrionário, em ambos os tratamentos, apresentaram oscilações ao longo da germinação, porém diferiram muito pouco entre si (Figura 7A). Entretanto, aos 8 DAS o teor de cloreto foi maior no tratamento salino. Já para o endosperma, os teores de Cl^- aumentaram com o tempo de germinação, tanto em condições controle como de estresse salino, porém, até 6 DAS não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 7B). Aos 7 e 8 DAS, os teores desse íon foram 87,0 e 39,0 % maiores sob condições de salinidade que no controle, respectivamente, (Figura 7B).

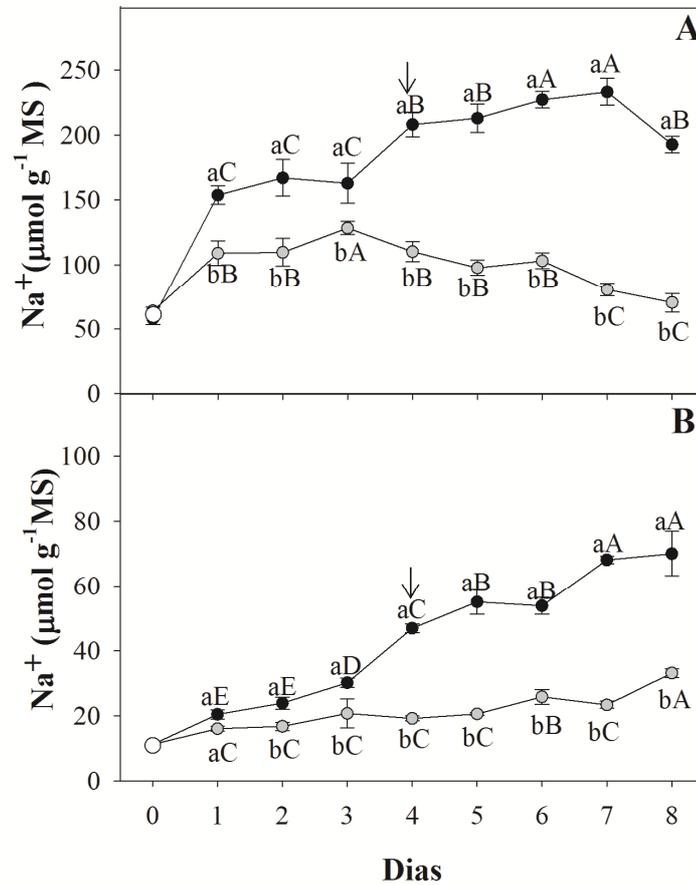


Figura 6. Teores de Na⁺ no eixo embrionário (A) e no endosperma (B) de sementes de pinhão-mansó sob condições controle (○) e de estresse salino (●). Os valores da semente quiescente são apresentados como referência (○). Valores com mesmas letras minúsculas, dentro dos tratamentos, ou com mesmas letras maiúsculas nos tempos avaliados, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média e a seta indica o dia da protrusão da radícula.

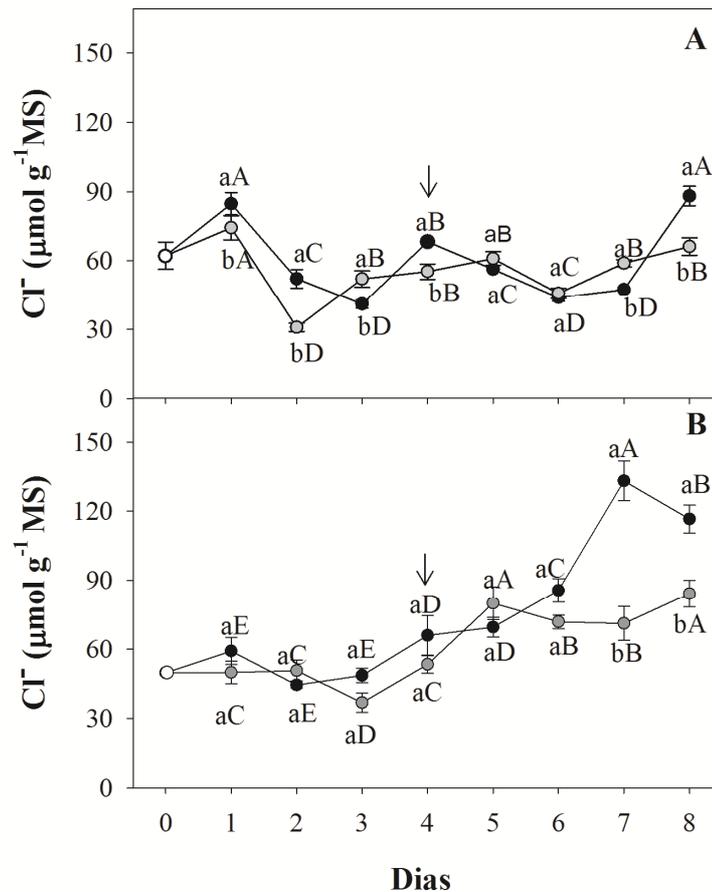


Figura 7. Teores de Cl^- no eixo embrionário (A) e no endosperma (B) de sementes de pinhão-mansó sob condições controle (○) e de estresse salino (●). Os teores na semente quiescente são apresentados como referência (○). Valores com mesmas letras minúsculas, dentro dos tratamentos, ou com mesmas letras maiúsculas nos tempos avaliados, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média e a seta indica o dia da protrusão da radícula.

Com relação aos teores de K^+ no eixo embrionário, não se observaram diferenças significativas até o 2º DAS, porém, aos 3 e 4 DAS houve incrementos significativos nos teores desse íon nos tratamentos controle e de estresse salino, respectivamente. Posteriormente a esse período, os teores de potássio se mantiveram praticamente inalterados até o final do período experimental, em ambos os tratamentos (Figura 8A). Já no endosperma, os teores desse íon não variaram significativamente entre si e nem com o tempo de germinação (Figura 8B).

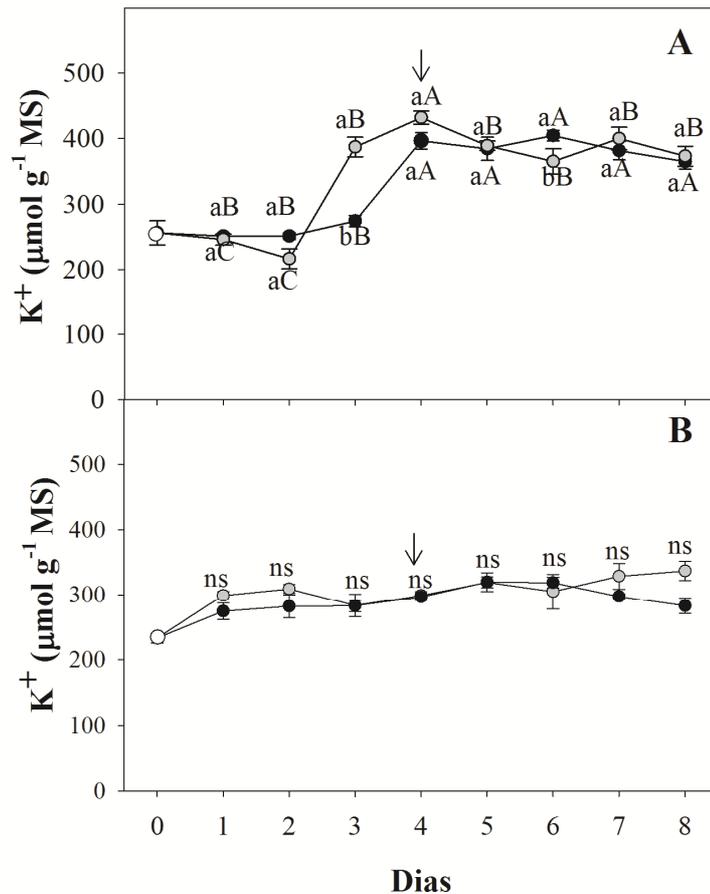


Figura 8. Teores de K^+ no eixo embrionário (A) e no endosperma (B) de sementes de pinhão-mansó sob condições controle (○) e de estresse salino (●). Os teores na semente quiescente são apresentados como referência (○). Valores com mesmas letras minúsculas, dentro dos tratamentos, ou com mesmas letras maiúsculas nos tempos avaliados, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média e a seta indica o dia da protrusão da radícula.

3.3 Experimento III – Caracterização da mobilização das reservas das sementes de pinhão-mansó submetidas ao estresse salino

3.3.1 Compostos de reserva e produtos de hidrólise

Os lipídios representaram os compostos mais abundantes encontrados no endosperma das sementes quiescentes de pinhão-mansó, representando 64,0% da massa seca desse tecido, seguido pelas proteínas com 22,0% da massa seca, enquanto que o amido correspondeu a apenas 5,5 % da massa seca do endosperma (Figura 9).

Os teores de lipídios no endosperma de sementes de pinhão-mansão permaneceram constantes do 1^o ao 4^o DAS (protrusão da raiz) e não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos controle e salino, nesse período (Figura 9A). No entanto, a partir do 5^o DAS, enquanto os teores de lipídios no tratamento salino apresentaram pequena diminuição, aqueles do controle apresentaram intensa redução, atingindo no 8^o DAS, um valor 59% menor que aquele do tratamento salino e 69% menor que aquele da semente quiescente.

Os teores de proteínas apresentaram comportamento semelhante ao observado para os lipídios (Figura 9B), sendo observadas diferenças significativas entre os tratamentos a partir dos 5 DAS. No último período avaliado aos 8 DAS, o teor dessa reserva no controle foi 39,5% menor que aquela do tratamento salino e 43,2% menor que aquela do endosperma da semente quiescente.

Os teores de amido se mantiveram praticamente constantes até o 3^o DAS, para ambos os tratamentos, apresentando apenas pequenas reduções (Figura 9C). Entretanto, posteriormente a esse período, observou-se um aumento transiente desse composto no controle quando, no 5^o DAS, o valor foi 76% maior que aquele da semente quiescente. Em seguida, os teores de amido decresceram e no final do período avaliado atingiram um valor 51,1% menor que aquele do endosperma de sementes quiescentes e igual àquele do tratamento salino, o qual permaneceu praticamente constante até o final do período estudado. (Figura 9C).

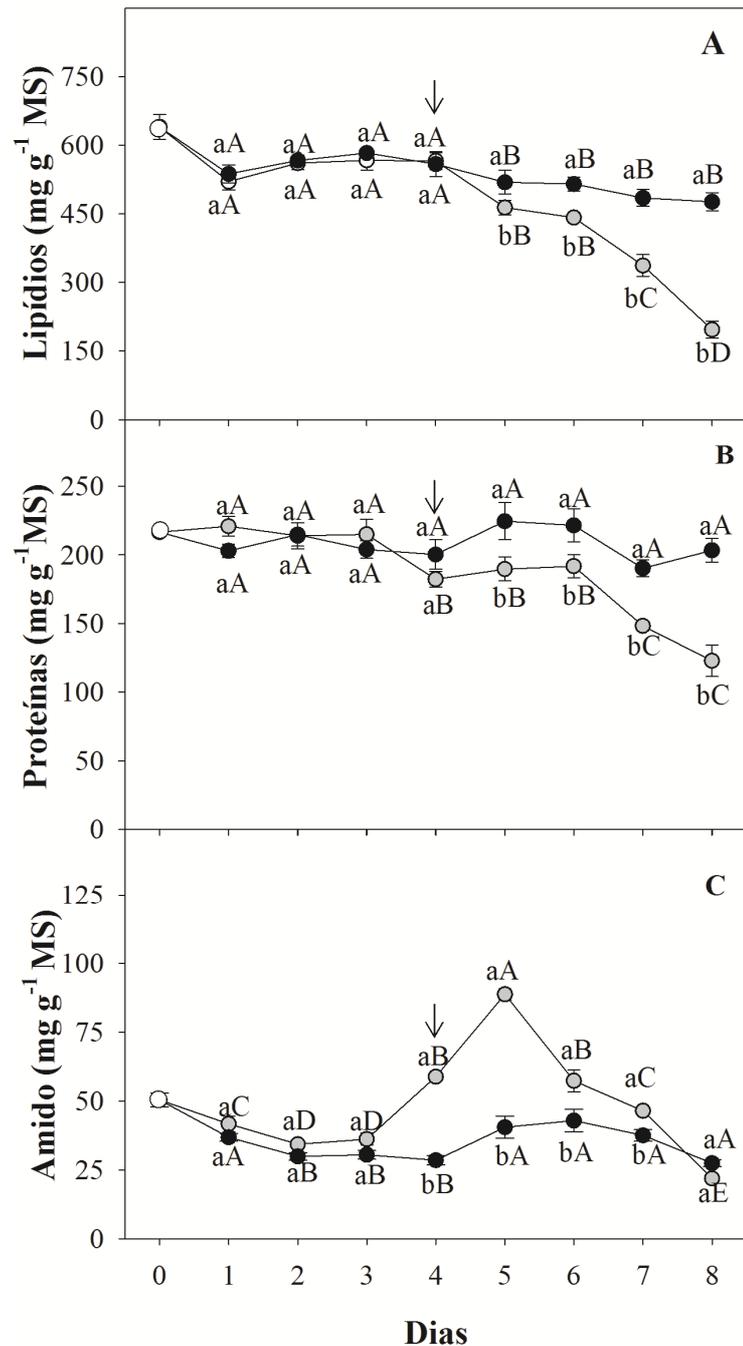


Figura 9. Teores de lipídios (A), proteínas (B) e amido (C) em endospermas de sementes de pinhão-mansó sob condições controle (○) e de estresse salino (●). Os teores na semente quiescente são apresentados como referência (○). Valores com mesmas letras minúsculas, dentro dos tratamentos, ou com mesmas letras maiúsculas nos tempos avaliados, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média e a seta indica o dia da protrusão da radícula.

Os açúcares solúveis permaneceram constantes até o 4^o DAS (dia da protrusão da radícula), não sendo observadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre o controle e o tratamento salino (Figura 10A). Após esse dia, o conteúdo de açúcares em ambos os tratamentos se mostrou crescente até o final do experimento, porém, ele foi mais elevado no tratamento controle, atingindo no 8^o DAS um valor 158% maior que aquele do tratamento salino (Figura 10A). Padrão semelhante a este, também, foi observado para os açúcares redutores (Figura 10B) e não redutores (Figura 10C), sendo que estes últimos foram mais abundantes que os redutores. No 8^o DAS, o teor de açúcar redutor no controle foi 9 vezes maior que aquele do tratamento salino, enquanto que o teor de açúcares não redutores em condições controle foram o dobro daquele em condições salinas (Figura 10B, C).

Os aminoácidos livres aumentaram significativamente para ambos os tratamentos ($P \leq 0,05$) ao longo do período avaliado (Figura 10D). Entretanto, os maiores incrementos foram observados no controle. No 8^o DAS, o teor de aminoácidos livres no controle foi o dobro daquele do tratamento salino (Figura 10D).

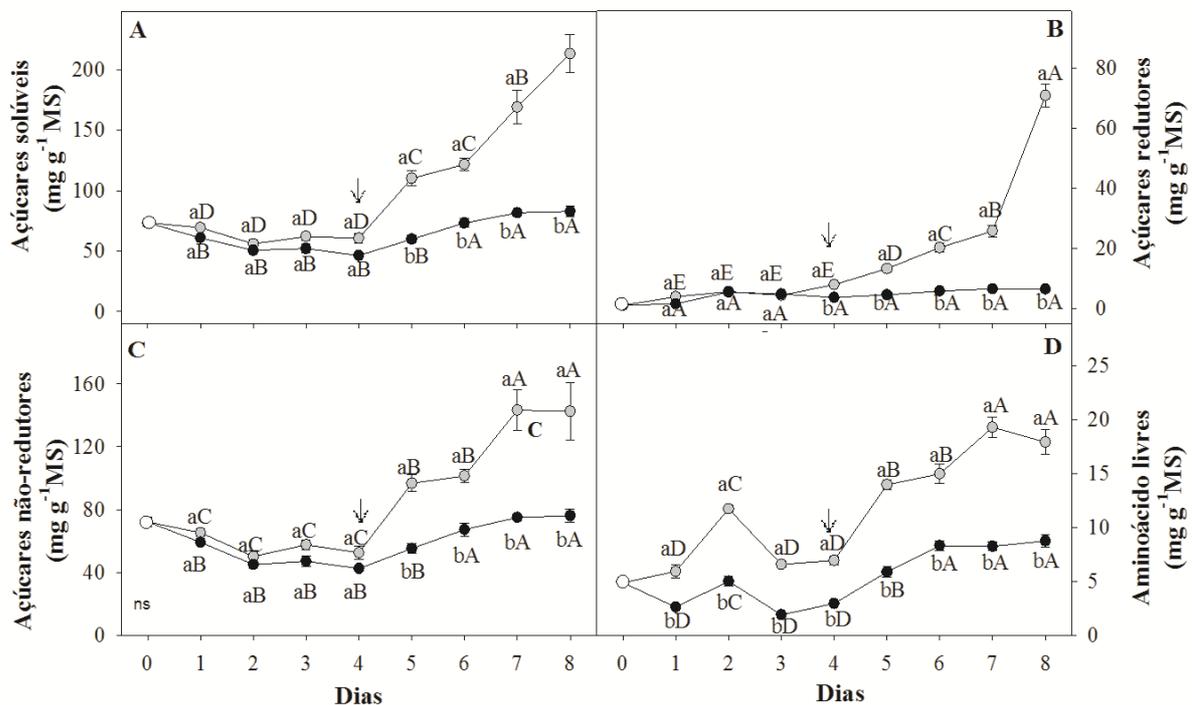


Figura 10. Teores de açúcares solúveis (A), açúcares redutores (B), açúcares não redutores (C) e aminoácidos livres (D) em endospermas de sementes de pinhão-mansô sob condições controle (○) e de estresse salino (●). Os teores na semente quiescente são apresentados como referência (○). Valores com mesmas letras minúsculas, dentro dos tratamentos, ou com mesmas letras maiúsculas nos tempos avaliados, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média e a seta indica o dia da protrusão da radícula.

3.3.2 Avaliação citoquímica da mobilização de reservas

As análises citoquímicas das sementes quiescentes de pinhão-mansão mostraram células endospermicas bastante desenvolvidas, com citoplasma completamente preenchido por glóbulos protéicos, corados com xylidine Ponceau (Figuras 11A, B). As seções submetidas à reação do ácido periódico/reagente de Schiff (PAS) mostraram paredes celulares finas, coradas em roxo, mas não se verificou reação positiva no citoplasma por esse método, o que indica ausência (ou pequena quantidade) de polissacarídeos nesse compartimento celular (Figuras 11C, D). Já nas seções coradas com Sudan IV, verificou-se grande quantidade de corpos lipídicos, os quais se encontravam distribuídos irregularmente no citoplasma, principalmente próximos à parede das células (Figura 11E, F).

Na figura 12, são mostradas seções de endospermas de sementes com 0, 4 e 8 DAS em condições controle e de estresse salino coradas com xylidine Ponceau. Os glóbulos proteicos nas sementes quiescentes se apresentavam distribuídos por todo o citoplasma dessas células (Figura 12A, B). Em condições controle, aos 4 DAS, foram verificadas redução e aglutinação dos glóbulos proteicos, os quais se mostraram menos distribuídos no citoplasma e concentrados em determinadas regiões das células (Figura 12C). Já no tratamento salino, apesar de também ter ocorrido a aglutinação dos corpos proteicos (Figura 12D), esta foi bem menos acentuada que no controle (Figura 12C).

Aos 8 DAS, no tratamento controle, houve acentuada redução dos corpos proteicos, sendo observado alguns deles aglutinados em algumas células, enquanto que em outras, praticamente não havia a presença dessas estruturas (Figura 12E). Adicionalmente, no tratamento salino aos 8 DAS, verificou-se intenso retardo na mobilização das reservas proteicas devido esse estresse (Figura 12F).

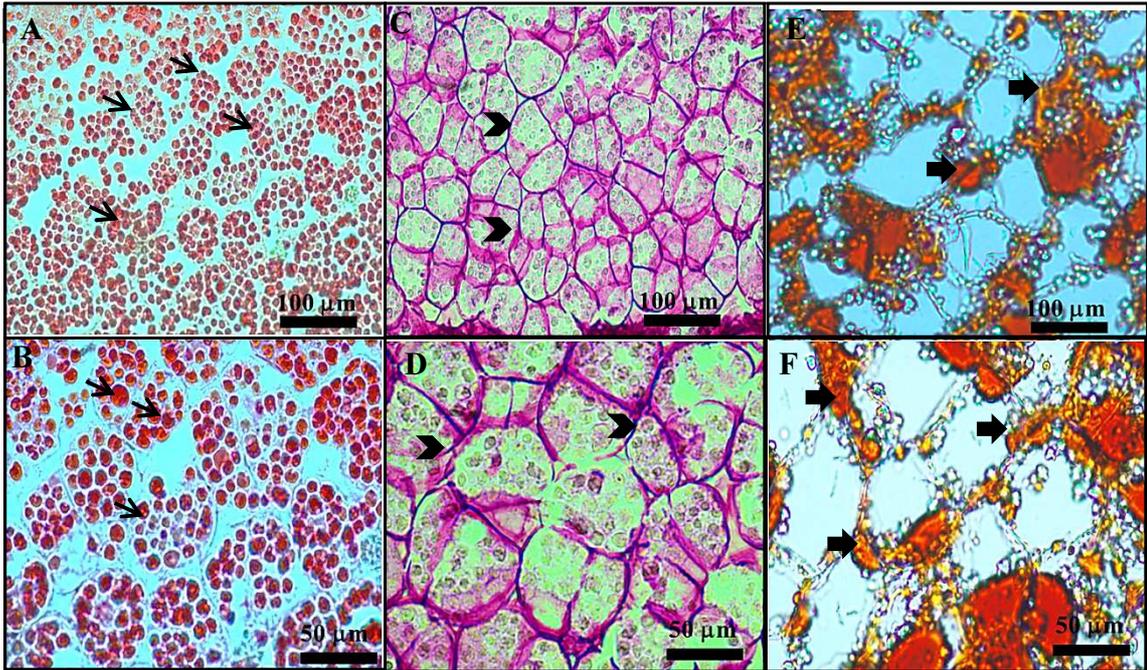


Figura 11. Seções transversais de endospermas de sementes quiescentes de pinhão-mansó coradas com: xylidine Ponceau, evidenciando os corpos proteicos (→ A e B); com ácido periódico/reagente de Schiff, evidenciando a parede celular (► C e D) e com Sudan IV, evidenciando os corpos lipídicos (► E e F).

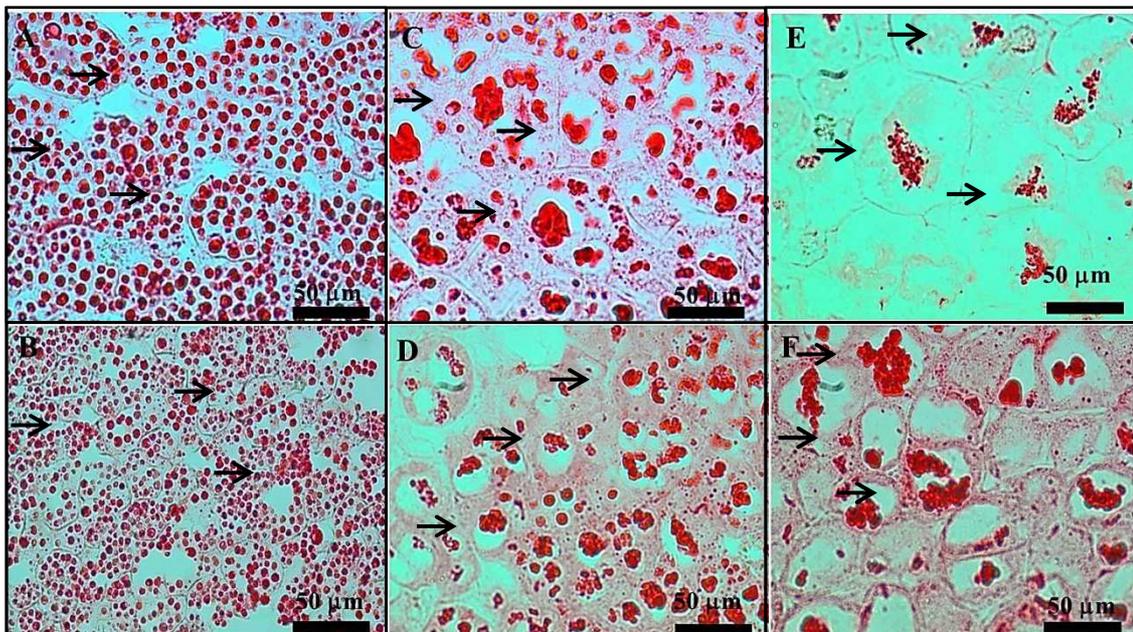


Figura 12. Seções transversais de endospermas de sementes de pinhão-mansó coradas com Xylidine Ponceau (XP), evidenciando os corpos proteicos (→). Sementes quiescentes (A, B), com 4 dias da embebição em condição controle (C), de estresse salino (D) e com 8 dias da embebição em condição controle (E) e de estresse salino (F).

As seções de endosperma de sementes de pinhão-mansó também foram intensamente coradas com Sudan IV, revelando uma abundante presença de corpos lipídicos (Figura 13). Essas estruturas na semente quiescente, se encontravam mais concentradas próximas à parede celular (Figura 13A, B), ao passo que aos 4 DAS na condição controle, houve redução do número dos corpos lipídicos (Figura 13C). Já na presença de sal, no mesmo período, não foi observada redução no número de corpos lipídicos (Figura 13D). Já aos 8 DAS, no controle, verificou-se uma mais intensa redução no número de corpos lipídicos (Figura 13E), o que não aconteceu na condição de estresse salino (Figura 13F).

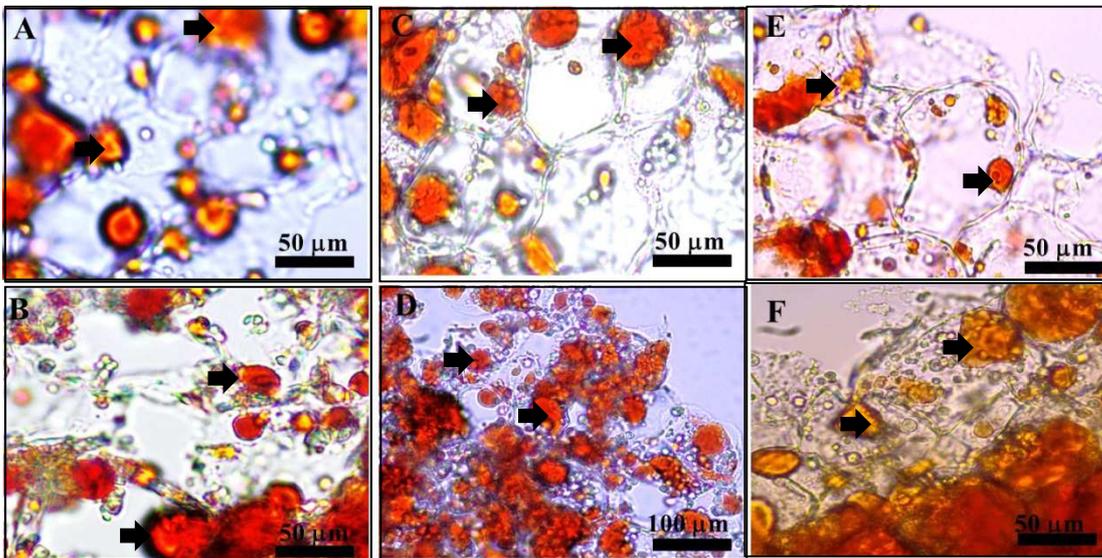


Figura 13. Seções transversais de endospermas de sementes de pinhão-mansó coradas com Sudan IV, evidenciando os corpos lipídicos (➡). Sementes quiescentes (A, B), com 4 dias da embebição em condição controle (C), de estresse salino (D) e com 8 dias da embebição em condição controle (E) e de estresse salino (F).

Nas seções coradas com o ácido periódico/reagente de Schiff (PAS), não houve reação positiva nos endospermas de sementes aos 4 e 8 DAS, tanto em condições controle (Figura 14A, C), como de estresse salino (Figura 14B, D). Com o reagente lugol, detectou-se pequena quantidade de amido nas células de semente quiescente (Figura 14E), porém o mesmo não foi observado aos 8 DAS sob condições controle (Figura 14F).

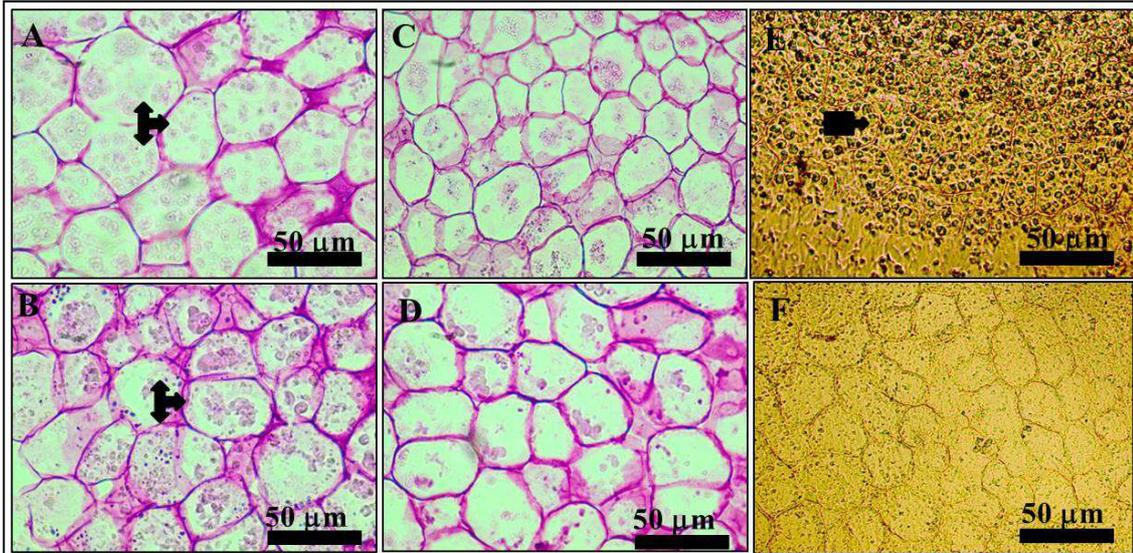


Figura 14. Seções transversais de endosperma de sementes de pinhão-mansó coradas com periodic acid-Schiff (PAS), aos 4 dias após a semeadura (DAS) em condições controle (A) e salina (B) e aos 8 DAS em condições controle (C) e salina (D), evidenciando a parede celular (↗). Seções coradas com lugol aos 0 DAS (E), evidenciando o amido (↗) e aos 8 DAS sob condições controle sem a presença de grânulos de amido (F).

3.3.3 Avaliação da mobilização de reservas por microscopia confocal

A análise de microscopia confocal foi concordante com os resultados obtidos por microscopia óptica (Figura 15), principalmente com relação aos corpos protéicos, os quais foram evidenciados na cor verde (Figura 15A, C) ou vermelha (dependendo do filtro de luz), devido à autofluorescência das proteínas (Figura 15B). Os corpos lipídicos não foram bem identificados por terem ficado sobrepostos por proteínas, porém ainda foi possível observá-los no formato de pequenos glóbulos alaranjados (Figura 15A). Três corpos lipídicos, corados na cor laranja, foram revelados pelo corante Nilo Red em seções de sementes quiescentes (Figura 15C) e aos 4DAS, próximos a parede celular (Figura 15E). A partir dos 4 DAS sob condições controle foi evidente a redução do número de corpos proteicos (Figura 15D), o que se intensificou aos 7 e 8 DAS (Figura 15G, H). Por outro lado, em condições de estresse salino, a mobilização proteica foi bastante retardada, sendo observado ainda grande número de corpos proteicos nas seções aos 4 DAS (Figura 15F) e aos 8 DAS (Figura 15I).

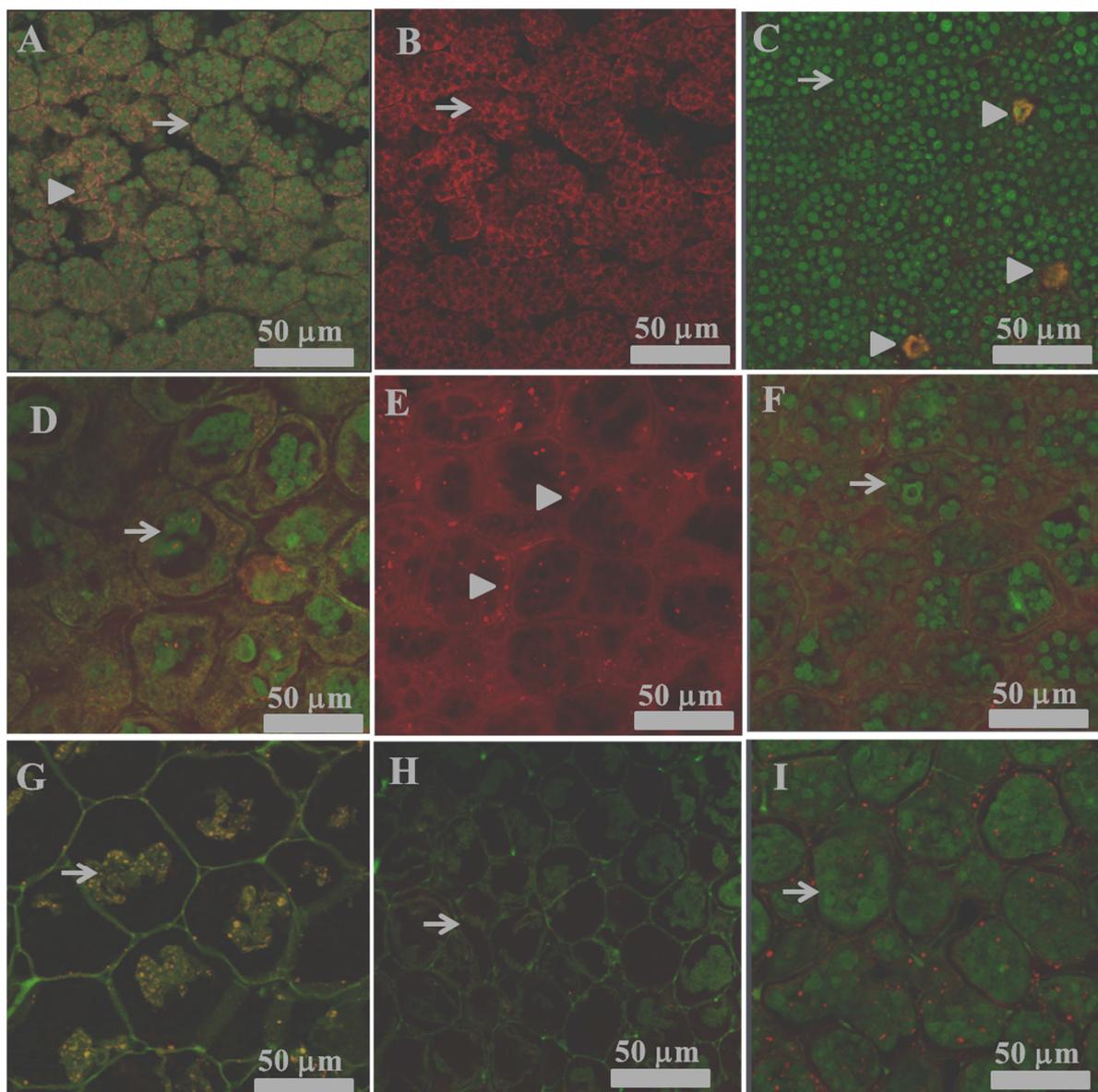


Figura 15. Seções transversais de endospermas de sementes de pinhão-mansó coradas com Nilo Red, evidenciando os corpos proteicos (→) e lipídicos (▶) em sementes quiescentes (A, B e C), com 4 dias após a semeadura (DAS) sob condições controle (D, E) e salino (F), com 7 (G) e 8 DAS (H) sob condições controle e com 8 DAS sob condições de estresse salino (I).

3.3.4 Avaliação ultraestrutural das sementes de pinhão-manso

As análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelaram a presença de vários corpos proteicos de diferentes tamanhos e formas nas células do endosperma de sementes quiescentes de *pinhão-manso* (Figura 16A, B, C). Os corpos lipídicos foram as estruturas mais abundantes observadas nas células endospermicas das sementes quiescentes, distribuindo-se regularmente em todo o citoplasma. Além dessas estruturas, pode-se também visualizar a parede celular (Figura 16A, B, C), sendo que nas seções visualizadas com maior ampliação da imagem tornaram-se evidentes as diferenças existentes entre os corpos proteicos e lipídicos (Figura 16C).

No endosperma de sementes aos 4 DAS em água destilada (controle), constatou-se que o número de corpos proteicos foi reduzido (em relação àquele das sementes quiescentes, ver figura 16A, B, C) e que houve aglomeração na porção central das células (Figura 16D). A mobilização dos corpos proteicos também foi observada em seções visualizadas numa maior ampliação da imagem, sendo observado que essas estruturas estavam completamente vazias (Figura 16E). Ainda aos 4 DAS, na imagem com maior ampliação, percebeu-se a presença de cloroplastos e de grânulos de amido, bem como a parede celular (Figura 16F). Por outro lado, em condições de estresse salino, essa mobilização foi fortemente reduzida, o que foi evidenciado pelo grande número de corpos proteicos existentes aos 4 DAS (Figura 16G, I). Na seção analisada com menor ampliação foi detectada a presença do núcleo celular, além das outras estruturas já mencionadas (Figura 16G). Em outra seção do endosperma, visualizada com maior ampliação foi observado a aglutinação de alguns corpos proteicos (Figura 16H), bem como sua forte mobilização (estruturas com sinais de degradação) (Figura 16I).

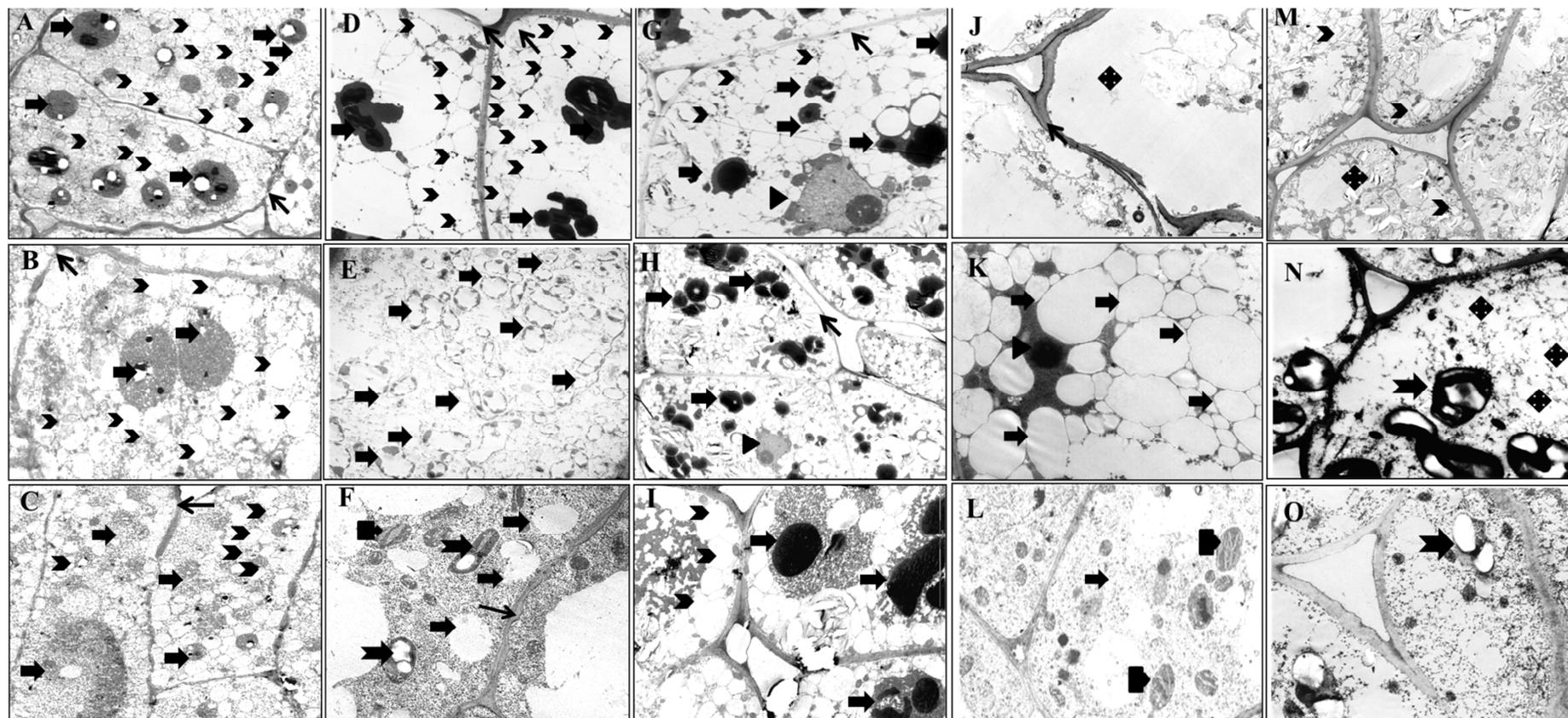


Figura 16. Ultramicografias de endospermas de sementes de pinhão-mansô: quiescente (A, B e C), com 4 dias após a sementeira (DAS) sob condições controle (D, E e F) e de estresse salino (G, H e I) e com 8 DAS sob condições controle (J, K e L) e de estresse salino (M, N e O). Ampliações: 2784X (A, J e M), 4646X (B, D, K e N); 6000X (C); 7750 X (E); 12930X (F); 2156 (G); 3597X (H e I) e 10000X (L e O). As seguintes estruturas estão assim indicadas nessa prancha: (➡) corpos proteicos; (➤) corpos lipídicos; (➔) parede celular; (➤) núcleo; (◆) citoplasma; (➤➤) grânulo de amido e (■) cloroplastos.

Os corpos lipídicos visualizados aos 4 DAS (Figura 16D), no tratamento controle, estavam mais concentrados próximos à parede celular e mostraram redução perceptível em relação aos observados nos endospermas de sementes quiescentes (Figura 16A, B, C). Já no tratamento salino, aos 4 DAS, observou-se a presença abundante de corpos lipídicos, os quais estavam distribuídos em todo o citoplasma (Figura 16G). Nesse mesmo dia, porém, numa maior ampliação da imagem, verificou-se a distribuição desses corpos lipídicos próximos à parede celular (Figura 16I).

Aos 8 DAS, em condições controle, a seção analisada em menor ampliação, mostrou a ausência de corpos proteicos e lipídicos, indicando a não detecção dessas estruturas nessa imagem (Figura 16J). Também aos 8 DAS, em outra seção em maior aumento, observou-se o surgimento de células vacuolares e a presença de um núcleo central bem desenvolvido (Figura 16K). Verificou-se também a presença de cloroplastos aos 8 DAS na condição controle, na maior ampliação analisada para esse período (Figura 16L). Por outro lado, nesse mesmo dia, em condições de estresse salino, pode-se observar, nessa seção, a pequena quantidade de corpos lipídicos próximos a parede celular (Figura 16M). O tratamento salino também promoveu a ruptura de algumas células, a desorganização do citoplasma e alteração do formato da célula (Figura 16M). Nas seções visualizadas com maior ampliação, foi evidenciada a presença de grânulos de amido, bem como a existência de material disperso no citoplasma, indicando o retardo na mobilização proteica (Figura 16N, O).

3.3.5 Composição dos ácidos graxos

A composição dos ácidos graxos das sementes de pinhão-mansão foi modificada ao longo da germinação, e os teores dessas substâncias foram alterados pelo estresse salino. Os ácidos graxos saturados de cadeia curta caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0) e mirístico (C14:0) foram detectados em baixa quantidade nas sementes de pinhão-mansão; ainda assim houve alterações nesses compostos durante a germinação, em decorrência do estresse salino (Figura 17). Na condição controle, os teores de ácido caprílico mantiveram-se praticamente inalterados ao longo da germinação, à exceção do 1^o e do 6^o DAS, em que houve aumentos proeminentes nesses teores, em comparação à semente quiescente (Figura 17A). Já na condição de estresse salino, os teores de ácido caprílico aumentaram entre o 2^o e 4^o DAS,

e, após esse período, retornaram ao nível inicial, permanecendo inalterados até o final da germinação (Figura 17A). Os teores de ácido cáprico das sementes germinadas na condição controle pouco variaram até o 6^o DAS, porém, aos 7 DAS, eles foram duas vezes maiores que o da semente quiescente. Na condição de estresse salino, os teores de ácido cáprico aumentaram ao longo da germinação e mostraram-se em quantidade superior à do tratamento controle até o 6^o DAS (Figura 17B). As variações nos teores de ácido láurico durante a germinação foram semelhantes às ocorridas com o ácido cáprico, tanto na condição controle, quanto na de estresse (Figura 17C). De modo geral, os teores de ácido mirístico aumentaram ao longo da germinação e foram sempre menores nas condições de salinidade, exceto aos 3 e 4 DAS, sendo essa diferença mais significantes entre os valores no controle e no estresse salino, ao longo da germinação, entretanto, o valor mais proeminente foi verificado aos 8 DAS (Figura 17D).

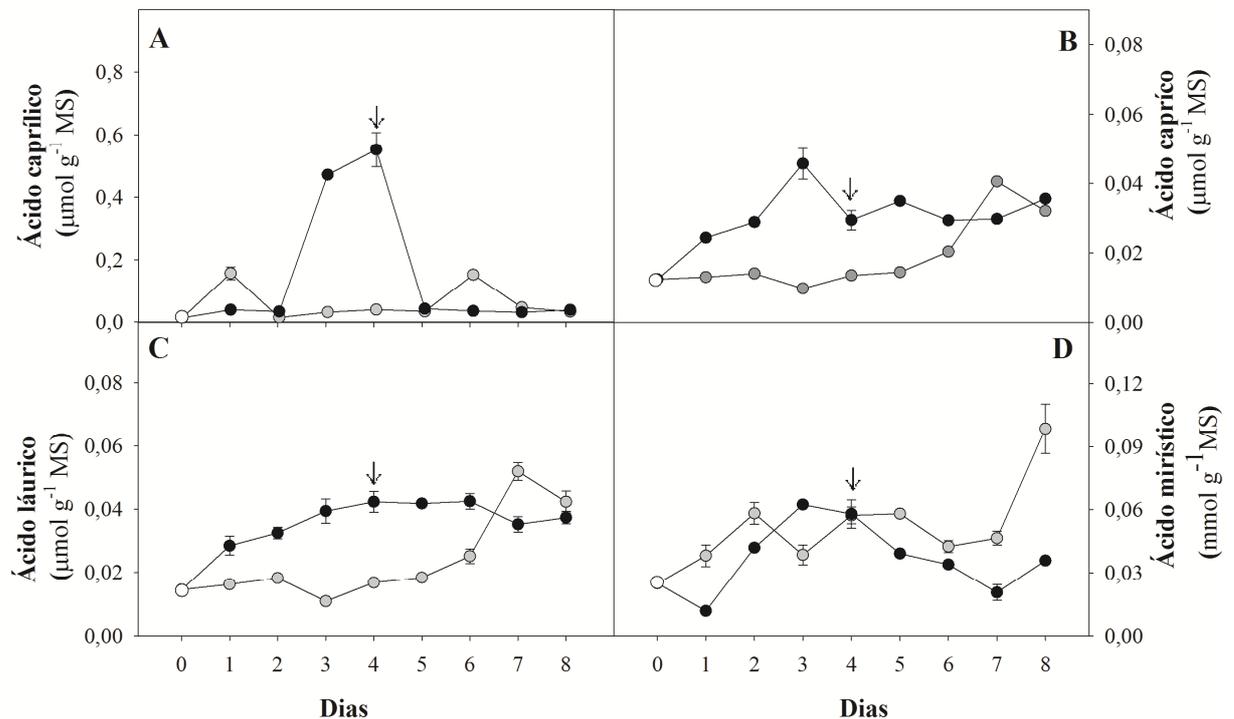


Figura 17. Teores dos ácidos caprílico (A), capríco (B), láurico (C) e mirístico (D) em endospermas de sementes de pinhão-mansó submetidas aos tratamentos controle (○) e salino (●). Os teores da semente quiescente (○) foram utilizados como referência. Os valores representam a média de três repetições de uma amostra combinada \pm erro padrão. A seta indica o dia da protrusão da radícula.

Os ácidos graxos palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), palmítico (C16:0) e oleico (C18:1) apresentaram-se em quantidades representativas nas sementes de pinhão-mansó, principalmente este último, e, de modo geral, houve um aumento nos teores dessas substâncias ao longo do período avaliado, independentemente da condição em que as sementes germinaram (Figura 18).

O palmítico foi o segundo ácido graxo mais abundante, entre os de cadeia longa; na condição controle, aos 8 DAS, os teores de ácido palmítico foram 300% maiores que os da semente quiescente, enquanto que, na condição salina, eles foram bem menos alterados, aumentando apenas 33,0% no último período avaliado. Apesar disso, os teores desse ácido graxo nas condições salinas foram em geral menores que os do controle (Figura 18A).

Com relação ao ácido palmitoleico, que correspondeu ao ácido graxo menos abundante entre os citados anteriormente, pode-se observar que as mudanças mais significativas, em função da salinidade, ocorreram a partir do 4^o DAS, quando os teores desse ácido graxo permaneceram sempre abaixo daqueles do controle (Figura 18B).

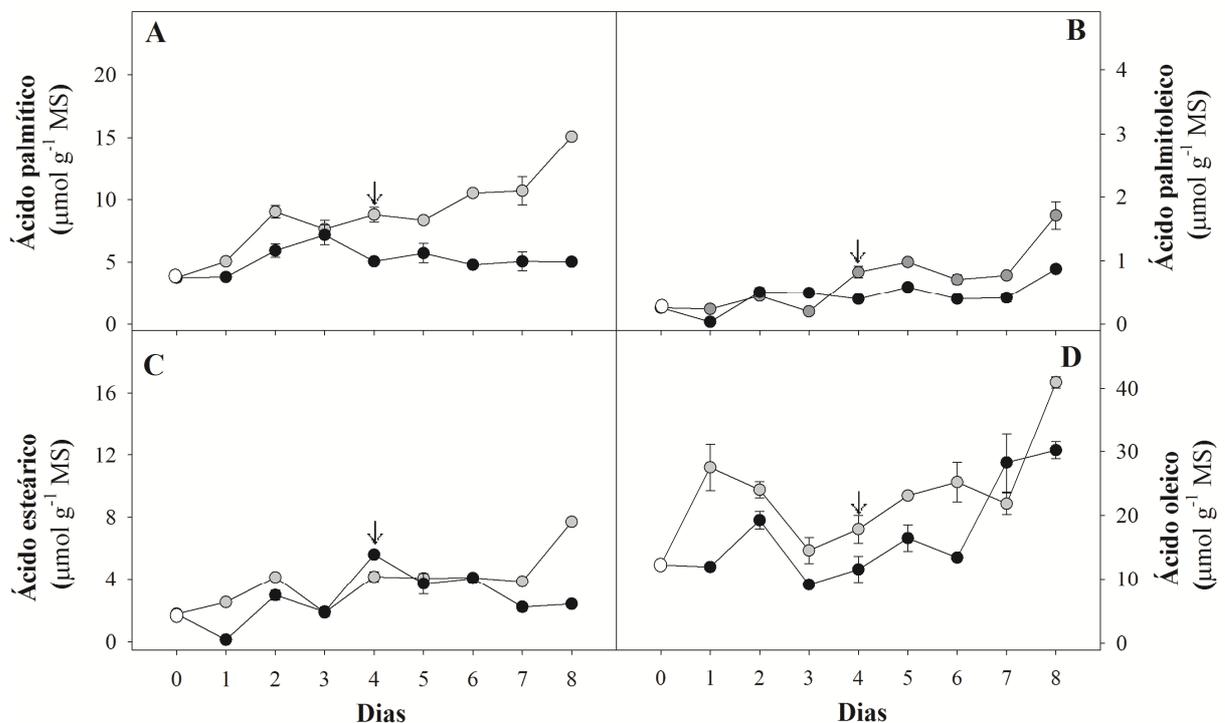


Figura 18. Teores dos ácidos palmítico (A), palmitoleico (B), esteárico (C) e oleico (D) em endospermas de sementes de pinhão-mansó submetidas aos tratamentos controle (○) e salino (●). Os teores da semente quiescente (○) foram utilizados como referência. Os valores representam a média de três repetições de uma amostra combinada \pm erro padrão. A seta indica o dia da protrusão da radícula.

Os teores de ácido esteárico foram pouco afetados pela salinidade até o 6º DAS, e nos dois últimos dias avaliados, eles foram reduzidos, em comparação ao controle, correspondendo a 68,8% aos 8 DAS (Figura 18C). Os teores de ácido oleico, por sua vez, corresponderam a 39,0% do conteúdo lipídico total na semente quiescente, e aumentaram marcadamente durante o período avaliado, alcançando aos 8 DAS, na condição controle, valores três vezes maiores que o da semente quiescente, enquanto que na condição salina o incremento foi de apenas 147% (Figura 18D).

Os ácidos graxos linoleico e linolênico (C18:2-C18:3), que são ácidos graxos poli-insaturados, foram observados no experimento de forma combinada (Figura 19A), destacaram-se entre os outros ácidos graxos, como os mais abundantes nas sementes de pinhão-manso (42,0% dos teores de lipídios totais das sementes quiescente). Estes apresentaram aumento durante a germinação, que foram cerca de cinco vezes o da semente quiescente aos 7 DAS, em condições controle. Por outro lado, em condições de estresse salino, o aumento foi menos pronunciado, porém também aos 7 DAS, verificou-se incremento superior a 150% em relação a semente quiescente. Aos 8DAS, observou-se redução nos teores desses ácidos graxos em relação ao período anterior, para ambos os tratamentos, sendo a condição salina a mais afetada (Figura 19A).

Os teores de ácido araquídico foram cerca de dez vezes menores que os dos ácidos graxos poli-insaturados e apresentaram reduções evidentes em função da salinidade, a partir do 7º DAS (Figura 19B). O ácido erúxico (C22:1) foi pouco representativo nas sementes de pinhão-manso, e os seus teores foram pouco alterados durante o período analisado; aos 6 DAS, houve uma redução evidente nos teores desse composto em decorrência da salinidade, que se manteve até os 8 DAS (Figura 19C).

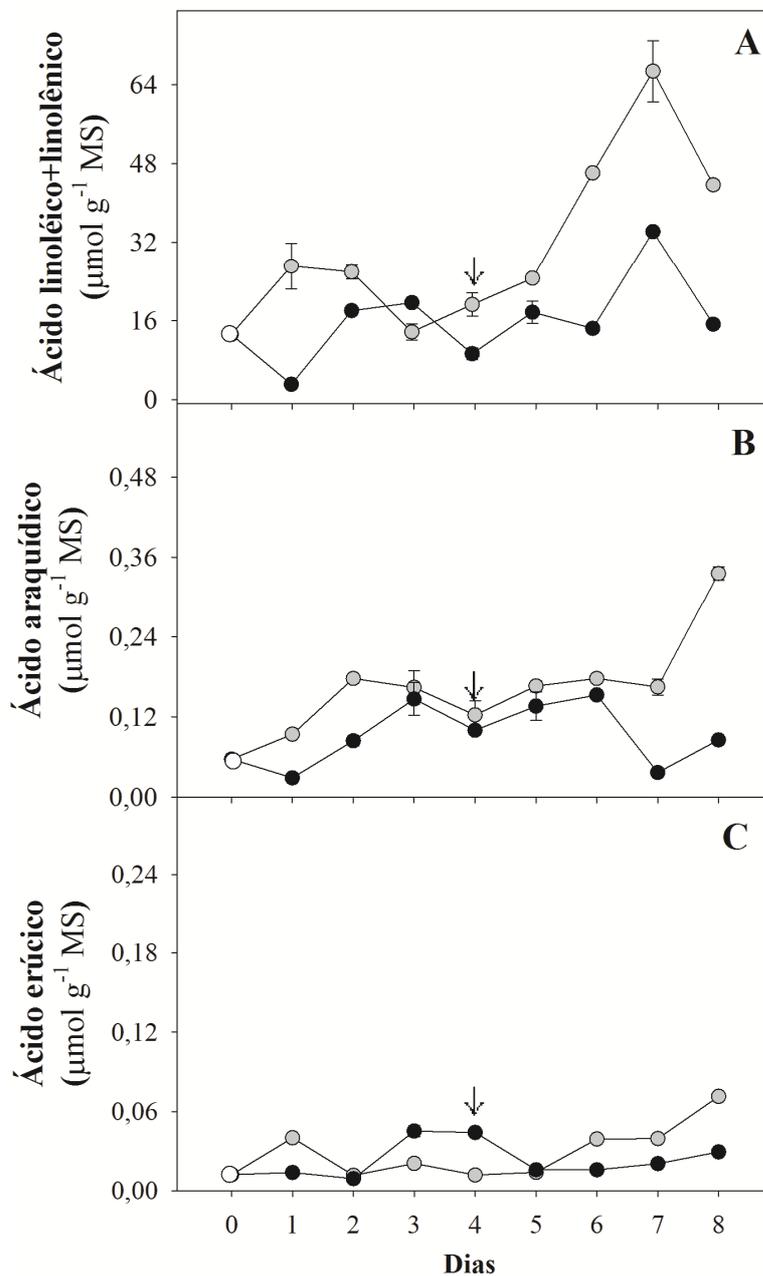


Figura 19. Teores dos ácidos linoleico/linolênico (A), araquídico (B) e erúcico (C) de endospermas de sementes de pinhão-mansó em condições controle (○) e de estresse salino (●). Os teores da semente quiescente (○) foram utilizados como referência. Os valores representam a média de três repetições de uma amostra combinada \pm erro padrão. A seta indica o dia da protrusão da radícula.

Os ácidos beênico (C22:0) e lignocérico (C24:0) foram pouco representativos nas sementes de pinhão-manso, e, mais uma vez, as principais alterações nos seus teores ocorreram após 4^o DAS (Figura 20). Enquanto os teores de ácido beênico aumentaram consideravelmente com a salinidade, os de ácido lignocérico reduziram, e as principais diferenças ocorreram no último dia de observação (8 DAS) (Figura 20).

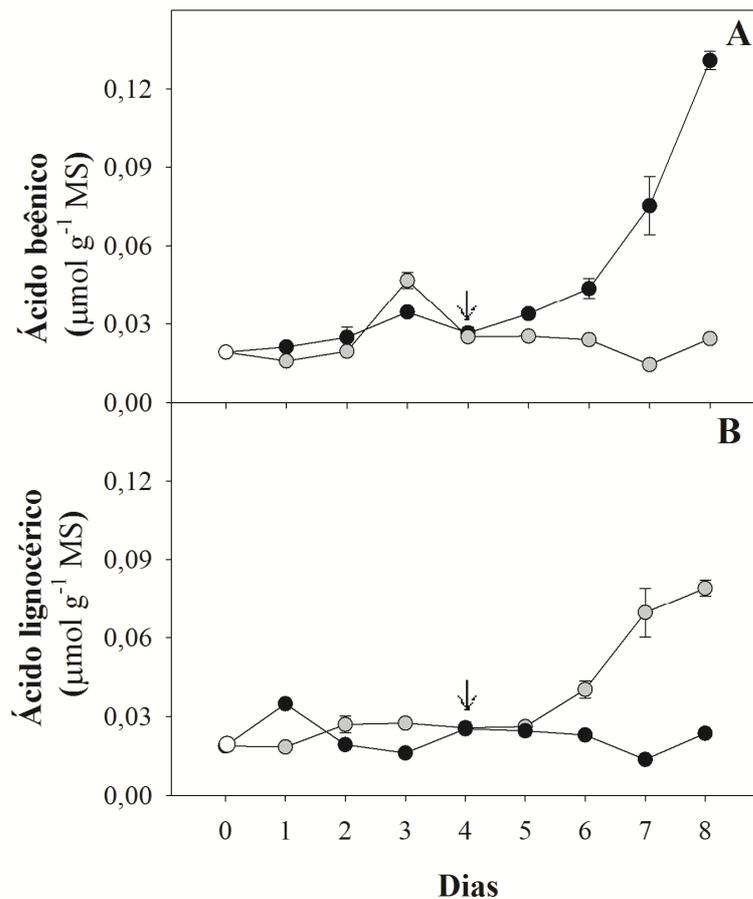


Figura 20. Teores dos ácidos graxos beênico (A) e lignocérico (B) de endospermas de sementes de pinhão-manso em condições controle (○) e de estresse salino (●). Os teores da semente quiescente (○) foram utilizados como referência. Os valores representam a média de três repetições de uma amostra combinada ± erro padrão. A seta indica o dia da protrusão da radícula.

3.4 Experimento IV-Atividade das enzimas do metabolismo lipídico das sementes e plântulas de pinhão-manso submetidas ao estresse salino

3.4.1 Atividade das enzimas do metabolismo lipídico

A atividade da lipase, na condição controle, aumentou ligeiramente até 24 horas após semeadura (HAS), sendo significativamente superior àquela do tratamento salino nesse mesmo período (Figuras 21A). Entre 24 e 72 HAS, a atividade lipásica não diferiu significativamente entre os tratamentos controle e salino, entretanto, a partir de 72 HAS, a atividade dessa enzima aumentou consideravelmente na condição controle, alcançando às 192 HAS um valor cerca de três vezes maior que aquele da semente quiescente; nesse mesmo período, o estresse salino inibiu a atividade lipásica, e no último tempo avaliado, houve redução de 73% nessa atividade, em relação ao controle, porém semelhantes às sementes quiescentes (Figura 21A).

A atividade da liase do isocitrato aumentou significativamente até 96 HAS, em ambas as condições de germinação, e declinou gradualmente até 192 HAS (Figura 21B). Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0,05$) até 120 HAS, exceto às 36 e 72 HAS, em que a atividade na condição controle foi maior que na condição salina (Figura 21B). A partir de 120 HAS, a atividade da liase do isocitrato foi inibida pela salinidade, especialmente no último tempo de avaliação (192 HAS), em que houve uma redução de 67% nessa variável, em relação ao controle (Figura 21B).

A atividade da sintase do malato foi reduzida significativamente até 24 HAS, na condição controle, e até 36 HAS, na condição salina, mas aumentou após tais tempos, embora tenha permanecido sempre em níveis menores que a da semente quiescente (Figura 21C). Inicialmente (até 24 HAS), ao se comparar ambas as condições de germinação, houve pouca variação na atividade da sintase do malato, mas ela foi reduzida pela salinidade entre 24 e 120 HAE. No período final de observação (192 HAS), a atividade da sintase do malato no tratamento salino foi 57% maior que a do controle (Figura 21C).

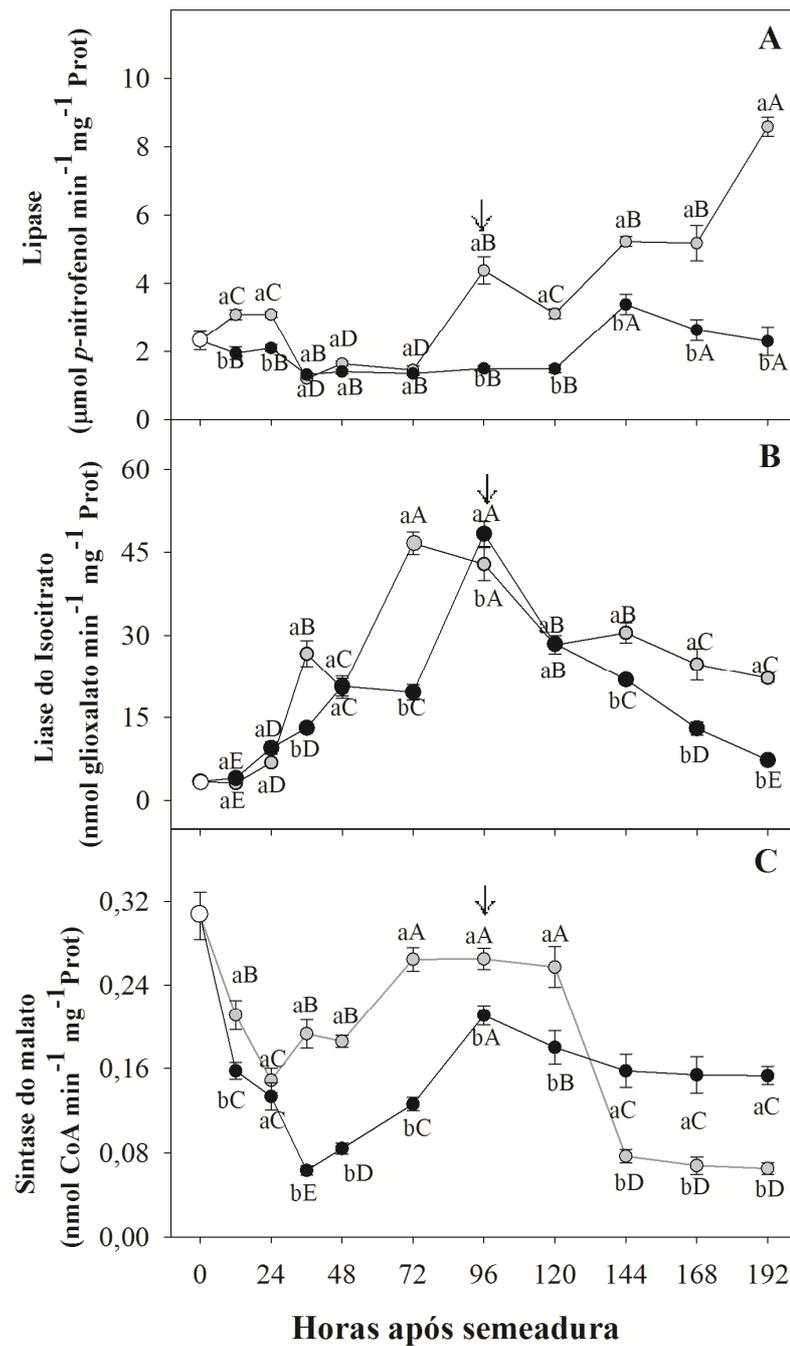


Figura 21. Atividade da lipase (A), liase do isocitrato (B) e sintase do malato (C) de endospermas de sementes de pinhão-mansó durante a germinação sob condições controle (●) e de estresse salino (●). Os valores na semente quiescente são apresentados como referência (○). Valores com mesmas letras minúsculas, dentro dos tratamentos, ou com mesmas letras maiúsculas nos tempos avaliados, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \geq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média e a seta indica o dia da protrusão da radícula.

3.4.2 Expressão gênica das enzimas do metabolismo lipídico

As relações de absorvância 260/280 e 260/230 variaram de 2,07 a 2,12 e de 2,30 a 2,49, respectivamente (Tabela 3). Esses valores indicaram que a qualidade do RNA era boa, e que não havia contaminação por proteínas e polissacarídeos, que prejudicariam as análises posteriores. Além disso, a concentração média de RNA obtida variou entre 244,87 e 1126,20 ng/mL e foi considerada suficiente para a obtenção do cDNA e para a realização das análises da expressão gênica. A integridade do RNA foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, a partir da qual se verificou o padrão de bandas correspondentes às subunidades ribossomais 18S e 28S (Figura 22).

A transcrição reversa do gene Actin 11 para todas as amostras de pinhão-mansão avaliadas, por meio de PCR semi-quantitativa, mostrou uma amplificação eficiente desse gene constitutivo, indicando uma boa qualidade dos cDNAs obtidos (Figura 23).

Tabela 3. Valores médios da concentração de RNA e das relações de absorvância A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} em amostras de RNA de endospermas de sementes de pinhão-mansão durante a germinação em condições controle (CONT) e de estresse salino (SAL).

AMOSTRAS	Concentração (ng mL ⁻¹)	Relação A_{260}/A_{280}	Relação A_{260}/A_{230}
0	575,77	2,07	2,30
12 CONT	244,87	2,10	2,39
12 SAL	247,27	2,10	2,37
24 CONT	485,17	2,12	2,47
24 SAL	597,57	2,07	2,33
72 CONT	846,47	2,08	2,49
72 SAL	1126,20	2,11	2,42
96 CONT	512,17	2,10	2,37
96 SAL	545,03	2,09	2,30
144 CONT	291,13	2,10	2,34
144SAL	728,73	2,12	2,31
168 CONT	325,70	2,11	2,30
168 SAL	972,87	2,12	2,37

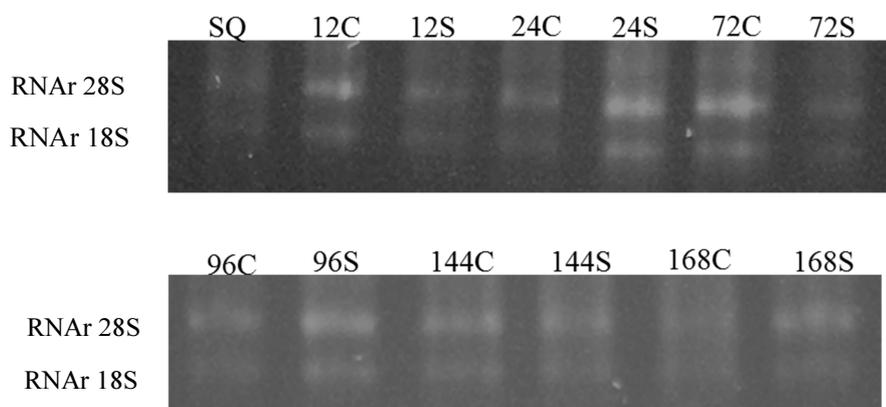


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose a 1%, evidenciando as bandas de RNA ribossomal 18S e 28S. As amostras analisadas foram: SQ (semente quiescente de pinhão-manso) ou com 12, 24, 72, 96, 144, 168 horas após a semeadura nas condições controle (C) e salina (S).



Figura 23. Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de amplificação do gene Actin 11 para avaliação da qualidade do cDNA obtido a partir de PCR semi - quantitativa. As amostras analisadas foram: SQ (semente quiescente de pinhão-manso) ou com 12, 24, 72, 96, 144, 168 horas após a semeadura nas condições controle (C) e salina (S).

3.4.2.2 *Perfil da expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídios por qPCR*

A expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídios foi avaliada em endospermas de sementes em diferentes períodos de embebição, tanto na condição controle, quanto na de estresse salino (Figura 24). A análise da expressão gênica revelou que todos os genes testados foram funcionais, à exceção do gene da sintase do malato, cuja expressão não foi detectada. Em adição, a expressão dos demais genes variou ao longo da germinação, sendo também influenciada pelo estresse salino (Figura 24). A expressão relativa do gene da liase do isocitrato mostrou diferenças ao longo da germinação, e foi máxima às 12 HAE, na condição controle (valor cerca de nove vezes maior que o da semente quiescente), reduzindo em seguida e mantendo-se inalterada até 96 HAE, a partir de quando ela aumentou ligeiramente às 168 HAE. Na condição salina, não se observou o pico de expressão às 12 HAE, referido acima, e os níveis de transcritos mantiveram-se equivalentes aos do controle até 96 HAE, sendo fortemente reduzido a um valor 78% menor pela salinidade às 168 HAE, (Figura 24A).

Em relação à enzima lipase, foi analisado o perfil da expressão gênica das suas duas isoformas, triacilglicerol lipase I e II. Ambas as isoformas foram afetadas pelo estresse salino, sendo que a lipase II foi a que apresentou diferenças mais pronunciadas em decorrência desse estresse. Na condição controle, houve um aumento no nível dos transcritos da lipase I entre 0 e 24 HAE, apresentando valores que foram cerca de quatro vezes superiores àqueles da semente quiescente; após esse tempo, a expressão relativa do gene da lipase I reduziu, e, às 168 HAE, apresentou um ligeiro aumento (Figura 24B). Em condições de estresse salino, a expressão relativa do gene da lipase I foi sempre maior que a da semente quiescente (0 HAE), sendo afetada por esse estresse apenas às 24 e 168 HAE, apresentando, nesses tempos, reduções de 67% e 61,0%, respectivamente (Figura 24B). A expressão relativa da lipase II foi máxima na semente quiescente (0 HAE), e se manteve inalterada até 12 HAE, na condição controle, reduzindo paulatinamente a partir desse tempo; na condição salina, porém, os níveis de transcritos do gene dessa enzima foram drasticamente reduzidos pela salinidade tão logo se iniciou a embebição das sementes, permanecendo inferiores aos respectivos níveis do controle, em todos os tempos observados (Figura 24C).

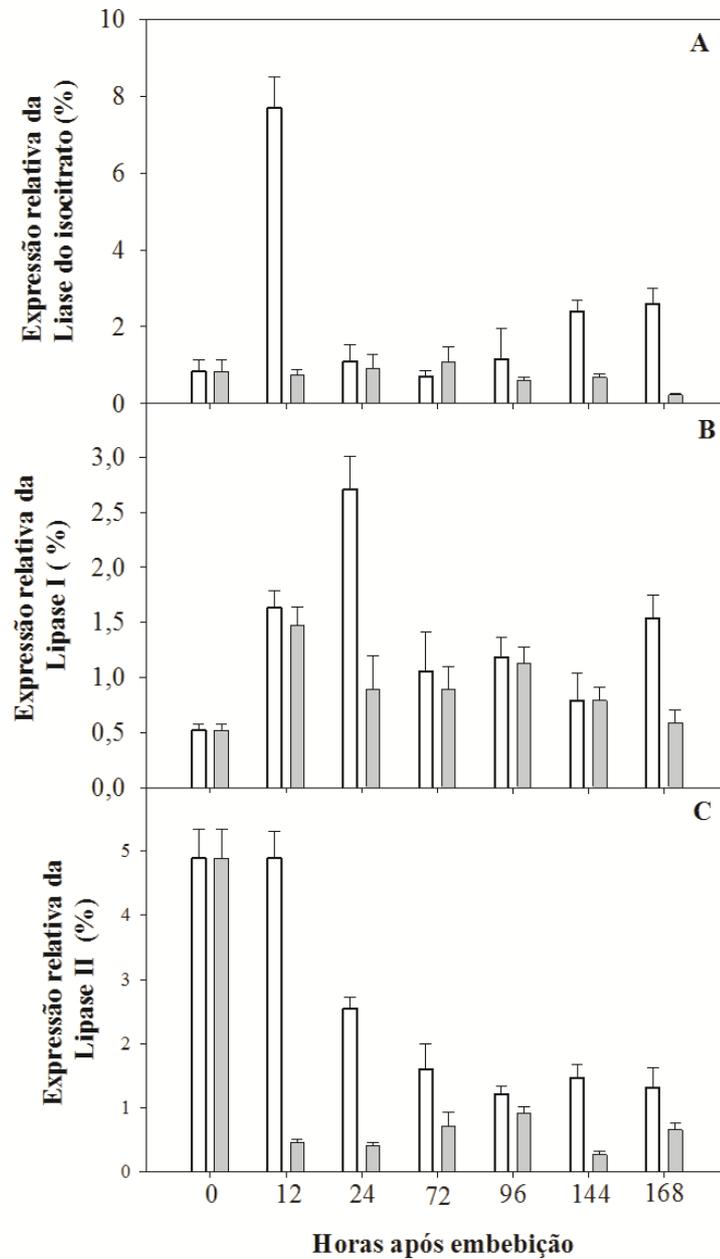


Figura 24. Expressão relativa dos genes da família multigênica da liase do isocitrato (A), e das isoformas da lipase triacilglicerol I (B) e II (C). O cDNA foi obtido de endospermas de sementes de pinhão-mansó coletados em 0 (SQ), 12, 24, 72, 96, 144 e 168 HAE, submetidas a condição controle (□) e de estresse salino (■). O valor representa a média de 3 repetições \pm erro padrão

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no primeiro experimento demonstraram que o estresse salino teve efeito deletério sobre a germinação de sementes de pinhão-manso, o que foi confirmado pela redução significativa nos parâmetros germinativos. Porém, isso ocorreu mais intensamente nas doses de 100 e 150 mM de NaCl, enquanto que na concentração de 50 mM de NaCl, os efeitos negativos do tratamento salino sobre os parâmetros germinativos foram menos acentuados (Figura 4). O estresse salino foi mais danoso sobre a porcentagem de germinação (%G) e o índice de velocidade de germinação (IVG), enquanto que o tempo médio de germinação (TMG) foi pouco afetado. Os resultados obtidos indicaram que a dose de 150 mM de NaCl reduziu fortemente a %G e o IVG (em cerca de 90%) não sendo por isso utilizada nos outros experimentos com as sementes de pinhão-manso, por ser a concentração de NaCl que inibiu quase completamente a germinação. Por outro lado, a dose de 100 mM de NaCl provocou uma redução em torno de 40 a 50% nesses dois parâmetros, sendo, portanto, a selecionada para os estudos posteriores. Nesse experimento, demonstrou-se que o aumento da concentração de NaCl no papel germitest afetou negativamente a germinação, porém em concentrações moderadas (50 mM de NaCl), os parâmetros germinativos apresentaram valores semelhantes àqueles da condição controle.

De forma semelhante a esse estudo, Andréo-Souza *et al.* (2010) também avaliaram a germinação de sementes de pinhão-manso em concentrações crescentes de NaCl. Estes autores utilizaram dois lotes de sementes de pinhão-manso e verificaram reduções significativas no IVG e %G, nas sementes submetidas às doses mais elevadas de NaCl a 10 e 12 dS m⁻¹ para o lote 1 (aproximadamente a concentrações de NaCl a 100 e 120 mM, respectivamente), enquanto o lote 2 foi mais sensível e apresentou redução na germinação na menor dose de NaCl a 6 dS m⁻¹, correspondendo a concentração de NaCl a 60 mM (ANDRÉO-SOUZA *et al.*, 2010). Em estudo que avaliou a tolerância da mamoneira à salinidade, que é também uma espécie da família euforbiácea, observou-se que a germinação dessa planta não foi afetada pelo incremento de sais no meio de crescimento, até a concentração de NaCl a 4,7 dS m⁻¹ (aproximadamente 47 mM de NaCl) (CAVALCANTI *et al.*, 2005).

Os danos sobre a germinação e desenvolvimento de plântulas têm sido abordados em vários estudos com outras oleaginosas, como por exemplo, em: girassol (ASHRAF *et al.*, 2003); cajueiro anão-precoce (MARQUES *et al.*, 2011; MARQUES *et al.*, 2013); mamona (CAVALCANTI *et al.*, 2005); soja (BERTAGNOLLI *et al.*, 2004). De acordo com Góis *et al.*

(2008), a capacidade de germinar em condições de salinidade pode ser utilizada como um indicador de tolerância a esse estresse, durante essa fase e nas etapas subsequentes do desenvolvimento da planta. Para o pinhão-manso, considerando os resultados obtidos nesse experimento, pode-se dizer que as suas sementes são mais tolerantes à salinidade durante a fase germinativa do que na fase de desenvolvimento das plântulas, já que os parâmetros germinativos analisados foram pouco alterados até a protrusão da radícula.

No segundo experimento, em concordância com os resultados obtidos no primeiro, também foram verificados efeitos deletérios da salinidade sobre o crescimento das plântulas, o que foi confirmado pela redução significativa da massa seca do eixo embrionário em relação ao controle (Figura 5A). Por outro lado, a massa seca do endosperma foi pouca modificada pelo tratamento salino (Figura 5B), sugerindo que pode ter ocorrido a inibição da utilização das reservas, em decorrência do acúmulo de íons tóxicos, especialmente de Na^+ (Figuras 6). Os dados obtidos com relação à matéria seca também indicam que o desenvolvimento inicial das plântulas foi mais comprometido que o processo germinativo, tendo em vista que a maior alteração na matéria seca ocorreu após a protrusão da radícula aos 4 DAS. Além disso, é interessante ressaltar que o incremento significativo observado na massa seca do eixo embrionário observado aos 8 DAS, pode estar relacionado ao fato de que seus cotilédones já estavam esverdeados, o que também pode estar associado à atividade fotossintética. Andréo-Souza *et al.* (2010) verificaram redução no crescimento das plântulas de pinhão-manso quando submetidas à solução de NaCl com condutividade elétrica de 6 dS m^{-1} . Em estudo que avaliou os efeitos da salinidade sobre os parâmetros de crescimento de mamoneira, verificou-se que o número de folhas, diâmetro do caule e altura foram significativamente reduzidos pelo incremento do NaCl no meio (CAVALCANTI *et al.*, 2005).

Os íons Na^+ foram os que mais aumentaram, em ambos os tecidos analisados, em função da salinidade (Figura 6). Devido a isso, esse íon tóxico pode ser considerado como o principal responsável pelos efeitos negativos do estresse salino observados nesse estudo. Apesar de não ter apresentado grandes mudanças no eixo embrionário, os íons Cl^- devem ter contribuído para a inibição do desenvolvimento das plântulas de pinhão-manso, devido ao fato desse íon ter aumentado no endosperma, após o 6º DAS, (Figura 7). De forma oposta, o íon Na^+ já aumentou significativamente antes da protrusão da radícula (4 DAS), sugerindo que este íon apresentou efeitos deletérios tanto na germinação, como no desenvolvimento das plântulas de pinhão-manso. Comparando-se os incrementos de Na^+ e Cl^- no eixo embrionário e no endosperma de sementes de pinhão-manso, foi evidente que o Na^+ foi mais severo para a germinação e crescimento das plântulas que o Cl^- . Por outro lado, de forma contrária aos

outros íons analisados, o íon K^+ não foi alterado em função da salinidade, tanto no endosperma como no eixo embrionário (Figura 8).

Similarmente a este estudo, Marques *et al.* (2013) descreveram que os teores de Na^+ e Cl^- aumentaram progressivamente em todos os estágios de desenvolvimento das sementes de cajueiro anão-precoce. Além disso, estes autores também descreveram que o conteúdo de K^+ não foi alterado significativamente pelo estresse salino. Resultados semelhantes também foram observados por Ashraf e Wahid (2003), que descreveram efeitos negativos do acúmulo dos íons Na^+ e Cl^- sobre a germinação de sementes de girassol. Estes autores reportaram ainda que estes íons aumentaram nas folhas e raízes.

O acúmulo de íons e o crescimento de plântulas de pinhão-manso com 28 dias foram avaliados por Silva *et al.* (2009a), que descreveram o aumento de Na^+ e Cl^- nas folhas e raízes de pinhão-manso, que foi proporcional ao incremento de $NaCl$, contudo o conteúdo de K^+ foi reduzido tanto em folhas, quanto em raízes em função do aumento da salinidade. Comparando esses resultados aos do presente estudo, pode-se dizer que existe semelhança em relação ao acúmulo de Na^+ e Cl^- , sendo que aqui ocorre no eixo embrionário. Já com relação ao K^+ , existe diferença, pelo fato de que no presente estudo, esse íon se manteve praticamente inalterado.

Os lipídios, como observado no terceiro experimento, foram os principais compostos de reserva dessas sementes, correspondendo a 64,0% da matéria seca dos endospermas da semente quiescente (Figura 9A). Resultados semelhantes foram observados por Yang *et al.* (2009), em que os teores de lipídios corresponderam a 62,0% na semente quiescente de pinhão-manso. Esses autores também observaram que, após quatro dias da semeadura em condições controle, esta reserva foi reduzida a apenas 33,7%, valor que se aproxima do aqui observado para essa reserva, porém aos 7 DAS. Os lipídios são considerados os principais compostos de reserva de sementes de *Helianthus annuus*, *Brassica napus* e *Ricinus communis* (SOUZA *et al.*, 2009). A mobilização de reservas de sementes oleaginosas vem sendo estudada em outras espécies como *Euphorbia heterophylla* (SUDA; GIORGINI, 2000), *Apuleia leucocarpa* (PONTES *et al.*, 2002), *Arabidopsis* (PRITCHARD *et al.*, 2002; PEINFELD *et al.*, 2005), *Cereus jamacaru* (ALENCAR *et al.*, 2012) e *J. curcas* (YANG *et al.*, 2009).

A abundância das reservas lipídicas nas sementes quiescentes de pinhão-manso foi confirmada pelas análises de microscopia de luz e eletrônica (Figuras 13 e 16A, B). Estas análises revelaram um grande número de corpos lipídicos distribuídos por todo o citoplasma das células endospermicas dessas sementes. Estudos recentes têm corroborado com o presente

trabalho, sendo também verificada abundância dos corpos lipídicos em endospermas de *J. curcas*, em condições não-estressantes por meio de análises ultraestruturas e bioquímicas (YANG *et al.*, 2009; REALE *et al.*, 2012).

No presente trabalho, também foi verificado que a mobilização das reservas lipídicas foi acentuadamente reduzida em condição de estresse salino em comparação ao controle, sendo verificado principalmente na fase de plântula (Figura 9A). A forte redução na utilização das reservas lipídicas em condições de estresse salino pode estar relacionada ao efeito deletério do acúmulo dos íons tóxicos, Na^+ e Cl^- , nos tecidos de reserva e, especialmente, o do Na^+ no eixo embrionário (Figura 6A). Este íon já apresentava maiores teores na fase pré-germinativa, porém os seus efeitos se tornaram mais acentuados na fase de desenvolvimento das plântulas, considerando-se as variáveis bioquímicas.

Os resultados das análises bioquímicas para os lipídios foram corroborados pelo intenso decréscimo dos corpos lipídicos no endosperma de sementes de pinhão-manso, especialmente nas seções observadas aos 8 DAS (Figuras 16J, L), evidenciando a mais rápida mobilização dos lipídios na ausência de sal. Por outro lado, o atraso na mobilização dos lipídios na presença de NaCl a 100 mM observados a partir dos 5 DAS (Figura 9A) foi coincidente com a observação nas seções aos 8 DAS por microscopia eletrônica, de alguns corpos lipídicos, confirmando o retardo na mobilização das reservas lipídicas (Figuras 16M, N, O). Baseado nessas observações, pode-se sugerir que o acúmulo de íons tóxicos, principalmente dos íons Na^+ , após a protrusão da radícula (4 DAS) retardaram a utilização das reservas lipídicas contidas no endosperma, inibindo a degradação dos corpos lipídicos e consequentemente a utilização dessas reservas, o que foi confirmado pela redução da massa seca do eixo embrionário em condição de estresse salino.

Corroborando com este estudo, a mobilização dos lipídios também foi retardada em cotilédones de plântulas de alfafa submetidas aos estresses salino por NaCl e Na_2SO_4 (BARANOVA *et al.*, 2007). Em oposição ao observado neste experimento, Oliveira *et al.* (2011) descreveram que as sementes de sorgo forrageiro submetidas ao estresse salino, apresentaram pequenas alterações morfológicas e citoquímicas em condições de estresse salino.

O efeito da salinidade sobre a mobilização das reservas em sementes de cajueiro anão-precoce foi avaliado por Marques *et al.* (2011) e (2013), que relataram retardo na mobilização dos lipídios. Estes autores descreveram uma rápida mobilização das reservas lipídicas sob condição controle, enquanto que, sob estresse salino, este processo foi fortemente reduzido. Adicionalmente, o retardo na degradação dos lipídios pela salinidade foi

observado em outras espécies, como milho (ASHRAF; WAHID, 2000), trigo (SOLTANI *et al.*, 2006) e girassol (ASHRAF; WAHID, 2003). Em sementes de girassol submetidas aos estresses por NaCl e por Ni foi observado retardo nos processos de mobilização dessas sementes devido a esses estresses (ASHRAF *et al.*, 2011).

As proteínas, a segunda principal reserva das sementes de pinhão-mansão (22% da matéria seca dos endospermas cf. figura 9B) tiveram sua mobilização também afetada negativamente pelo estresse salino, principalmente a partir do 5^o DAS (Figura 9B). Este resultado pode ter contribuído com a menor quantidade de aminoácidos livres disponíveis para a formação dos tecidos das plântulas, o que foi evidenciado por seus mais baixos teores em condições de estresse salino (Figura 10D). É interessante ressaltar que os teores de proteínas foram afetados pelo estresse salino apenas durante a fase de desenvolvimento das plântulas, ao passo que os teores de aminoácidos apresentaram alterações tanto na fase de germinação quanto na de plântulas. Corroborando com este estudo, Marques *et al.* (2013) descreveram a inibição da mobilização de proteínas em cotilédones de sementes de cajueiro anão-precoce em condições de estresse salino, bem como redução dos teores de aminoácidos livres nos estágios iniciais de desenvolvimento das plântulas.

As mudanças nos corpos proteicos e na sua mobilização observadas pelas análises citoquímicas e ultraestruturais (Figuras 12, 15, 16G, N) confirmaram o efeito negativo do estresse salino sobre as reservas proteicas. A análise por microscopia além de confirmar as análises bioquímicas também mostrou a intensa mobilização das reservas proteicas e lipídicas até o final do período analisado, devido a maior sensibilidade desses métodos em relação aos bioquímicos. A mobilização proteica por análise ultraestrutural também foi estudada por Muccifora *et al.* (2010), para *Mucuna pruriens*, que verificaram que a mobilização destas reservas nos cotilédones foi mais intensa após a germinação. Em um estudo realizado sobre a avaliação citoquímica de sementes de pinhão-mansão em condições controle, descreveu-se também a abundância de corpos proteicos nos citoplasma dessas sementes e uma pequena quantidade de amido (LOPES *et al.*, 2013).

No presente estudo, assim como o realizado por Lopes *et al.* (2013), a presença de amido foi pouco detectada nos endospermas de sementes de pinhão-mansão (cerca de 5,5% da matéria seca, cf. figura 9C). Lopes *et al.* (2013) descreveram que a pequena quantidade de amido observada pode estar relacionada a abundância de corpos proteicos nos endospermas dessas semente que se sobrepõem aos grânulos de amido, impedindo a sua detecção. Apesar de ter sido detectada pequena quantidade de amido nos endospermas das sementes de pinhão-mansão, houve aumento transiente dessa reserva após a emergência da radícula (entre os 4 e 5

DAS). Em seguida, a partir dos 6 DAS, estas reservas foram fortemente consumidas, indicando a sua disponibilidade para o desenvolvimento inicial das plântulas. A presença de grânulos de amido foi confirmado por microscopia de luz (Figura 14E) e eletrônica (Figura 16O) aos 8 DAS no controle e estresse salino, sugerindo que nesse período já pode ter se iniciado a atividade fotossintética dessas plântulas, tendo em vista que seus cotilédones já se mostraram esverdeados.

Além dessas observações sobre os teores de amido, também é importante destacar que o significativo aumento dos seus teores ocorreu durante o início da mobilização dos lipídios (Figura 9A), que posteriormente deveriam ser convertidos em açúcares solúveis (Figura 10A, B); porém como no início da germinação provavelmente não houve o uso suficiente desses açúcares, pode ter ocorrido o aumento transiente de amido entre os 4 e 5 DAS (Figura 9C). O acúmulo transiente de amido também foi reportado anteriormente para outras oleaginosas como cajueiro anão-precoce (VOIGT *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2013). Também foi observado o mesmo acúmulo para sementes de *Prosopis juliflora*, no qual houve um aumento de 50% após 48 horas de embebição, seguido de redução após esse período (GALLÃO *et al.*, 2007).

Dentre os açúcares solúveis, os não-redutores foram mais representativos, em termos quantitativos, que os açúcares-redutores (Figura 10A, B, C) e apresentaram incrementos significativos ao longo do período avaliado, sugerindo sua relevância para o desenvolvimento das plântulas de pinhão-manso. O incremento observado para os teores dos açúcares solúveis e não-redutores após a protrusão da radícula (4 DAS) foi bastante correlacionado com a redução dos teores de lipídios nesse mesmo período (Figura 9A), sugerindo que essas reservas podem ter sido convertidas em açúcares como a sacarose que é a principal forma de transporte de açúcares nas plantas. Diferentemente ao observado no presente estudo, o estresse salino inibiu o consumo de açúcares não-redutores nos cotilédones de sementes e plântulas de cajueiro anão precoce, entretanto houve um acúmulo desses açúcares não-redutores em cotilédones de plântulas crescidas nos maiores níveis de NaCl (12 e 18 dS m⁻¹) (MARQUES *et al.*, 2013). Além disso, a redução do acúmulo de açúcares solúveis e, especialmente dos não-redutores, sob condições de estresse salino, pode representar um fator negativo para o desenvolvimento das plântulas, considerando que essas reservas são uma das principais usadas durante esse estágio (SÁNCHEZ-LINHARES *et al.*, 2012). Segundo esses autores, os açúcares não-redutores correspondem aos primeiros a serem usados no início da embebição das sementes de milho, promovendo o crescimento inicial do eixo embrionário até que a emergência da radícula aconteça.

Com relação às mudanças nos teores de ácidos graxos e as mudanças observadas no presente estudo (Figuras 17 a 20), assim como foi observado por Yang *et al.* (2009) para sementes de pinhão-mansão em condições controle, os ácidos graxos predominantes foram o oleico (C18:1) e o linoleico-linolênico (C18:2; C18:3), o que fisiologicamente podem indicar o aumento da tolerância ao estresse salino, como foi observado no presente estudo. Yang *et al.* (2009) observaram pequena quantidade de ácidos graxos de cadeia longa ($C > 20$), o que também ocorreu no presente estudo. Alguns autores reportam que o baixo conteúdo de ácidos graxos de cadeia longa e o alto conteúdo de ácido linoleico, que é insaturado, podem aumentar a fluidez e a permeabilidade das membranas, facilitando vários processos de transporte através dessas estruturas (BUCHANAN *et al.*, 2000). Adicionalmente, essas características dos óleos das sementes de *J. curcas* são consideradas importantes para a produção de biodiesel (ADAMSKA *et al.*, 2004; GOODRUM *et al.*, 2005).

Dos treze ácidos graxos detectados neste experimento, dez deles foram afetados negativamente pela salinidade, destacando-se o esteárico, linoleico-linolênico, mirístico, palmítico, palmitoleico e oleico, que foram os mais abundantes nos endospermas de sementes de pinhão-mansão, em todas as condições avaliadas. A redução dos teores desses ácidos graxos, em condições de estresse salino em relação ao controle, pode estar relacionada à redução da atividade da lipase causada pela salinidade, especialmente na fase de desenvolvimento das plântulas (Figura 21A). Por outro lado, o incremento observado nos teores de ácido palmítico (ácido graxo saturado mais abundante), no tratamento controle ao longo do período avaliado, sugere que esse ácido é muito importante para a formação das novas estruturas das plântulas em desenvolvimento. Esses dados são confirmados pelo estudo realizado por Yang *et al.* (2009) também com sementes de pinhão-mansão em condições controle, onde também foi observado incremento de ácido palmítico ao longo da germinação. Em estudo sobre a composição dos óleos das sementes de *Allium tuberosum*, os ácidos linoléico e palmítico, corresponderam aos ácidos graxos insaturados e saturados mais abundantes, respectivamente (HU *et al.*, 2005). No presente estudo, não foi possível obter os ácidos graxos linoléico e α -linolênico isoladamente, devido a impossibilidade de separação com a coluna cromatográfica utilizada.

Os ácidos graxos insaturados mais abundantes, oleico e a mistura linoleico + linolênico, apresentaram diferentes padrões nos tratamentos analisados (Figuras 18D e 19A). O incremento dos teores de linoléico e/ou linolênico (C18:2-C18:3) em condição controle pode ter ocorrido pela conversão do oleico (C18:1) pela ação de dessaturases. Yeilaghi *et al.* (2012) descreveram significativo aumento nos teores de ácido oleico em sementes de

Carthamus tinctorius L., em condições de estresse salino, enquanto que os ácidos linoleico e linolênico foram significativamente reduzidos. Este comportamento pode ter ocorrido pela inibição da dessaturase do ácido oleico pela salinidade, que provavelmente contribuiu para o seu acúmulo (YEILAGHI *et al.*, 2012). Mudanças na razão de saturação entre ácidos graxos saturados e insaturados foram observadas em sementes de girassol germinadas em condições de estresse salino, bem como a redução da concentração de triacilgliceróis formados por ácidos graxos insaturados (SMAOUI; CHÉRIF, 2000; FLAGELLA *et al.*, 2004).

As atividades das enzimas analisadas (lipase, sintase do malato e liase do isocitrato), como observado no quarto experimento, foram afetadas negativamente pela salinidade (Figuras 21, 22 e 23). O incremento na atividade da lipase ao longo da germinação, em condições controle, foi correspondente à intensa mobilização observada para os lipídios (Figuras 9A e 21A), bem como ao aumento nos teores dos ácidos graxos analisados nos últimos períodos de germinação, com exceção aos ácidos de cadeia curta (Figura 17). De forma semelhante, o retardo na mobilização dos lipídios em condições de estresse salino, coincidiu com a redução na atividade específica da lipase após os 4 DAS, em condições de estresse (Figura 9A e 21A). Por outro lado, os efeitos negativos do estresse salino sobre a lipase se manifestaram antes do que o observado para os teores de lipídios. Corroborando com este estudo, Marques *et al.* (2013) verificaram que a mobilização lipídica em cotilédones de cajueiro anão-precoce foi acompanhada pelo aumento da atividade da lipase. Além disso, esses mesmos autores descreveram que o estresse salino promoveu a inibição da mobilização dos lipídios, sendo isso diretamente relacionado à inibição da atividade dessa enzima. A redução na atividade enzimática em decorrência de um fator estressante, pode se relacionar à inibição da ativação da enzima ou à inibição de sua síntese *de novo*. Em cotilédones de feijão de corda, Gomes-Filho *et al.* (2008) observaram que a RNase pré-existia na semente quiescente, porém, sua ativação era inibida pela salinidade, durante a germinação.

No presente estudo, observou-se que a expressão relativa da lipase foi modificada ao longo da germinação e que o estresse salino também afetou negativamente a expressão dos genes dessa enzima (Figuras 24B, C). É interessante ressaltar que houve correlação positiva entre a expressão gênica e a atividade enzimática da lipase em condições controle. O aumento no nível de transcritos nos períodos iniciais de germinação resultou no aumento da síntese desta enzima, o que se correlacionou com o aumento de sua atividade durante o desenvolvimento da plântula (cf. observado a partir das 96 HAE). Já em condições de estresse salino, a menor atividade enzimática da lipase pode estar relacionada ao mais baixo nível de transcritos observados para essa enzima. Recentemente, uma correlação positiva entre o

aumento da atividade enzimática, através de sua regulação pela expressão gênica, foi verificada para a enzima catalase em milho (GONDIM *et al.*, 2012). Neste estudo, os autores relataram que o nível de transcritos e a atividade da enzima catalase foram incrementados quando as plântulas de milho foram submetidas ao estresse salino e pré-tratadas com H₂O₂ foliar.

O incremento na atividade da liase do isocitrato até o 5^o DAS, sob condições controle (Figura 21B), foi condizente com um forte aumento nos teores de açúcares solúveis, especialmente os não redutores, a partir do 5^o DAS (Figura 10A, B). Este processo ressalta a importância desta enzima na mobilização de reservas lipídicas durante o ciclo do glioxalato, que posteriormente podem ser convertidos em açúcares pela gliconeogênese. Em sementes oleaginosas, a enzima liase do isocitrato desempenha papel crucial no metabolismo dos lipídios, por realizar a conversão do acetil Co-A ao succinato, este substrato, posteriormente será usado para a conversão em açúcares como a sacarose pela a gliconeogênes (Eastmond; Graham, 2001).

Diferente do observado para a enzima lipase, não foi verificada correlação direta entre a atividade enzimática da liase do isocitrato e sua expressão gênica (Figura 24A). Provavelmente, o incremento na atividade dessa enzima não seja relacionado diretamente ao aumento dos transcritos, mas a uma maior ativação enzimática ou regulação traducional. Adicionalmente, é interessante destacar que houve uma maior ativação enzimática durante a germinação, independente do estresse salino; enquanto durante o estabelecimento de plântulas, houve redução na sua atividade, sendo mais acentuada na condição de estresse salino.

A atividade da liase do isocitrato foi avaliada em *Beta vulgaris* em condições controle e de estresse salino. Em condições de salinidade, a máxima atividade foi observada dois dias depois daquela observada em condições controle. A expressão relativa dos genes da liase do isocitrato também foi analisada e, para um dos clones de *Beta vulgaris*, essa expressão foi maior em sementes expostas ao tratamento salino do que no controle. Neste trabalho, ainda foi mencionado que houve abundância relativa de ESTs derivados dos genes das enzimas chaves do ciclo do glioxalato (liase do isocitrato e sintase do malato) em plantas germinadas em soluções de NaCl e H₂O₂ (DE LOS REYES *et al.*, 2003). Estudos anteriores descreveram que a expressão das enzimas liase do isocitrato e sintase do malato é regulada a nível de transcrição e são responsáveis por vários sinais metabólicos do ciclo do glioxilato (GRAHAM *et al.*, 2004)

O estudo da expressão gênica em integumentos e sementes em desenvolvimento de *J. curcas* foi reportado para os genes de peptidases cisteínicas, sendo constatada correlação com mudanças anatômicas nos integumentos e células dos endospermas (ROCHA *et al.*, 2003). Além disso, a expressão de genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos e lipídios em sementes em maturação também foi avaliada por Gu *et al.* (2012). Estes autores concluíram que a expressão dos genes envolvidos no metabolismo lipídico é altamente relacionada com a formação dos corpos lipídicos no endosperma dessas sementes, enquanto que os genes que codificam as enzimas com similar função podem ser diferencialmente expressos nesses tecidos (GU *et al.*, 2012). Entretanto, é importante ressaltar a escassez de informações sobre a expressão gênica das enzimas lipase, liase do isocitrato e sintase do malato em sementes de pinhão-manso durante germinação e desenvolvimento de plântulas sob condições de estresse salino, indicando que o presente trabalho contribuiu com os primeiros dados sobre esse assunto.

Os dados obtidos mostraram que os parâmetros fisiológicos e bioquímicos foram afetados de forma diferente pelo estresse salino. De maneira geral, a fase de desenvolvimento da plântula foi mais sensível aos efeitos deletérios do acúmulo dos íons tóxicos do que a fase de germinação, o que foi confirmado pelos dados de crescimento da matéria seca, e do atraso da mobilização de lipídios e proteínas, após a protrusão da radícula. Entretanto, a atividade das enzimas liase do isocitrato e sintase do malato já apresentaram redução em sua atividade em decorrência do estresse salino antes da protrusão da radícula, indicando que esse parâmetro é afetado na fase de germinação.

O presente estudo confirmou a enorme relevância dos lipídios como reserva para as sementes de *J. curcas*. Na ausência de estresse, a rápida mobilização desse composto coincide com o aumento da atividade lipásica e, possivelmente, contribui para o aumento transiente de amido. Sob condições de estresse salino, o acúmulo excessivo de Na^+ , no endosperma da semente, é considerado o principal responsável pelo retardo na mobilização das reservas, principalmente durante o desenvolvimento das plântulas. As análises citoquímicas e ultraestruturas confirmam os resultados obtidos nas análises bioquímicas e evidenciam as alterações negativas oriundas do estresse salino sobre as estruturas celulares de reservas. Dessa forma, o presente trabalho ampliou os conhecimentos, no âmbito da bioquímica, fisiologia, molecular e estrutural de sementes e plântulas de pinhão-manso submetidas ao estresse salino.

5 CONCLUSÕES

- 01.** A dose de 100 mM de NaCl foi selecionada para os estudos de mobilização de reservas de sementes de pinhão-manso por reduzir os parâmetros germinativos em aproximadamente 40 a 50% e não ter ocasionado a morte da plântula;
- 02.** A fase de desenvolvimento das plântulas foi mais sensível ao estresse salino do que a fase germinativa das sementes de pinhão-manso;
- 03.** O efeito inibitório do estresse salino sobre os processos de germinação, mobilização de reservas e desenvolvimento das plântulas de pinhão-manso foi associado principalmente ao acúmulo excessivo de Na^+ , sendo mais pronunciado após o 4^o dia de semeadura;
- 04.** Os açúcares foram fortemente reduzidos pela salinidade, a partir da protrusão da radícula, sendo essa variação diretamente relacionada à redução na mobilização de lipídios;
- 05.** A lipase é a principal enzima relacionada ao metabolismo de lipídios de pinhão-manso, haja vista que a redução na sua atividade, em condições de salinidade, limitou severamente a mobilização dos lipídios;
- 06.** A redução da atividade da lipase, em sementes submetidas ao estresse salino, ocorreu em função de uma regulação negativa sobre a expressão gênica;
- 07.** Sob condições de estresse salino, a redução dos ácidos graxos mais abundantes, insaturados oléico e linoléico/linolênico e os saturados palmítico e esteárico, durante o desenvolvimento das plântulas, foi atribuída a redução da atividade da lipase;
- 08.** As análises citoquímicas e ultraestruturais confirmaram as análises bioquímicas, no que diz respeito à degradação dos corpos lipídicos e proteicos de endospermas de sementes de *J. curcas* submetidas ao estresse salino;
- 09.** O presente trabalho contribuiu para a ampliação do conhecimento no âmbito bioquímico e molecular da germinação e desenvolvimento de plântulas de pinhão-manso submetidas ao estresse salino, bem como sobre as alterações ultraestruturais das células de endospermas durante essas fases de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

ACHTEN, W. M. J.; MAES, W. H.; REUBENS, B.; MATHIJS, E.; SINGHI, V. P.; VERCHOT, L.; MUYS, B. Biomass production and allocation in *Jatropha curcas* L. seedlings under different levels of drought stress. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 667-676, 2010.

ADAMSKA, E.; CEGIELSKA-TARAS, T.; KACZMAREK, Z.; SZALA, L. Multivariate approach to evaluating the fatty acid composition of seed oil in a doubled haploid population of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Journal of Applied Genetics**, v. 45, p. 419-425, 2004.

ADEBOWALE, K. O.; ADEDIRE, C. O. Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 307-310, 2006.

ALENCAR, N. L. M.; INNECCO, R.; GOMES-FILHO, E.; GALLÃO, M. I.; ALVAREZ-PIZARRO, J. C.; PRISCO, J. T.; OLIVEIRA, A. B. de. Seed reserve composition and mobilization during germination and early seedling establishment of *Cereus jamacaru* D.C. ssp. *jamacaru* (Cactaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, 823–832, 2012.

AL-KHATEEB, S. A. Effect of salinity and temperature on germination, growth and ion relations of *Panicum turgidum* Forssk. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 292-298, 2006.

ALTAN, A.; MCCARTHY, K. L.; TIKEKAR, R.; MCCARTHY, M. J.; NITIN, N. Image analysis of microstructural changes in almond cotyledon as a result of processing. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 212-221, 2011.

ANDRÉO-SOUZA, Y.; PEREIRA, A. L.; SILVA, F. F. S. S.; RIBEIRO, R. R. C.; EVANGELISTA, M. R. V.; CASTRO, R. D.; DANTAS, B. F. Efeito da salinidade na germinação de sementes e no crescimento inicial de mudas de pinhão-mansó. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 83-92, 2010.

ANNARAO, S.; SIDHU, O. P.; ROY, R.; TULI, R.; KHETRAPAL, C. L. Lipid profiling of developing *Jatropha curcas* L. seeds using HNMR spectroscopy. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 9032-9035, 2008.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 8, p. 789-799, 2004.

ASHRAF, M.; WAHID, S. Time-course changes in organic metabolites and mineral nutrients in germinating maize seeds under salt (NaCl) stress. **Seed Science and Technology**, v. 28, p. 641-656, 2000.

ASHRAF, M.; WAHID, S. Time-course changes in the inorganic and organic components of germinating sunflower achenes under salt (NaCl) stress. **Flora**, v.198, p. 26-36, 2003.

ASHRAF, M. Y.; SADIQ, R.; HUSSAIN, M.; ASHRAF, M.; AHMAD, M. S. A. Toxic effect of Nickel (Ni) on growth and metabolism in germinating seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Biological Trace Element Research**, v. 143, p. 1695-1703, 2011.

ASLAM, R.; BOSTAN, N.; MARIA, M.; SAFDAR, W. A critical review on halophytes: Salt tolerant plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 7108-7118, 2011.

AZEVEDO-NETO, A. D.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T. Salinity and oxidative stress. *In*: KHAN, N.A.; SINGH, S. (Ed.). **Abiotic Stress and Plant Responses**. Aligarh: IK International Group, 2008. p. 58-82.

BAETHGEN, W. E.; ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 20, p. 961-969, 1989.

BALERONI, C. R. S.; FERRARESE, M. L. L.; COSTA, S. C.; SOUZA, N. E.; FERRARESE-FILHO, O. Isocitrate lyase activity and mobilization of lipids and carbohydrates in cotyledons of canola. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 9, p.189-192, 1997.

BARANOVA, E. N.; GULEVICH, A. A.; POLYAKOV, V. Y. Effect of NaCl, Na₂SO₄, and mannitol on utilization of storage starch and formation of plastids in the cotyledons and roots of alfalfa seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 54, p. 50–57, 2007.

BEEVERS, H. The role of the glyoxylate cycle. *In*: STUMPF, P. K. (Ed.). **The Biochemistry of Plants: a comprehensive treatise**. Orlando: Academic Press, 1980. p. 117-130.

BEN-MILED, D. D.; ZARROUK, M.; CHÉRIF, A. Sodium chloride effects on lipase activity in germinating rape seeds. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, p. 899-902, 2000.

BERCHMANS, H. J.; HIRATA, S. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1716-1721, 2008.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976.

BERTAGNOLLI, C. M.; CUNHA, C. S. M.; MENEZES, S. M.; MORAES, D. M.; LOPES, N. F.; ABREU, C. M. Qualidade fisiológica e composição química de sementes de soja submetidas ao estresse salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, p. 287-291, 2004.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. Structure and Composition. *In: Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. New York: Springer, 2013. p. 1-25.

BEWLEY, J. D. Seed Germination and Dormancy. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1055-1066, 1997.

BHERING, L. L.; BARRERA, C. F.; ORTEGA, D.; LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A.; ROSADO, T. B.; CRUZ, C. D. Differential response of *Jatropha* genotypes to different selection methods indicates that combined selection is more suited than other methods for rapid improvement of the species. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 260-265, 2013.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BOREK, S.; RATAJCZAK, W. Sugars as a metabolic regulator of storage protein mobilization in germinating seeds of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.). **Acta Physiol. Plant.**, v. 24, p. 425-434, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSSEN, W.Y.; JONES, R.L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Biologists. Rockville, Maryland, 2000. 1367p.

BUCKERIDGE, M. S.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Acúmulo de reservas. *In*: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004a. p. 31-50.

BUCKERIDGE, M. S.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Mobilização de reservas. *In*: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004b. p. 163-188.

CAI, F.; MEI, L. J.; NA, X. L.; GAO, S.; TANG, L.; CHEN, F. Lipid peroxidation and antioxidant responses during seed germination of *Jatropha curcas*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 13, p. 25-30, 2011.

CAMPOS, M. L.; HSIE, B. S.; GRANJA, J.A.A.; CORREIA, R. M., ALMEIDA-CORTEZ, J. S. Photosynthesis and antioxidant activity in *Jatropha curcas* L. under salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, p. 55–67, 2012.

CARELS, N. *Jatropha curcas*: a review. *In*: KADER, J. C.; DELSENY, M. (Eds.). **Advances in Botanical Research**. New York: Academic Press, 2009. p. 39-86.

CAVALCANTI, M. L. F.; FERNANDES, P. D.; GHEYI, H. R.; BARROS JÚNIOR, G.; SOARES, F. A. L.; SIQUEIRA, E. C. Tolerância da mamoneira BRS 149 à salinidade: Germinação e características de crescimento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, p.57-61, 2005.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, F. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 125, p. 1-10, 2008.

CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J. K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**, v. 45, p. 437-448, 2005.

CONTRAN, N.; CHESSA, L.; LUBINO, M.; BELLAVITE, D.; PAOLO, P.; ENNE, G. State-of-the-art of the *Jatropha curcas* productive chain: From sowing to biodiesel and by-products. **Industrial Crops & Products**, v. 42, p. 202–215, 2013.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; PONTES, C. A.; LEITE, I. T. A.; VENTRELLA, M. C.; MATHIAS, A. A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Brazilian Journal of Forest Science**, v. 30, p. 941-949, 2006.

COSTA, G. G. L.; CARDOSO, K. C.; DEL BEM, L. E. V.; LIMA, A. C.; CUNHA, M. A. S.; DE CAMPOS-LEITE, L.; VICENTINI, R. Transcriptome analysis of the oil-rich seed of the bioenergy crop *Jatropha curcas* L. **BMC Genomics**, vol. 11, p. 462, 2010.

CUELLAR-ORTIZ, S. M.; ARRIETA-MONTIEL, M. P.; COSTA-GALLEGOS, J.; COVARRUBIAS, A. A. Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. **Plant Cell and Environment**, v. 31, p. 1399-1409, 2008.

CUNHA, M. A. S. **Análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios de sementes de *Jatropha curcas* L.** 2011. 150p. Tese (Doutorado em Biotecnologia - RENORBIO), Universidade Federal do Ceará, 2011.

DE LOS REYES, B. G.; MYERS, S. J.; MCGRATH, J. M. Differential induction of glyoxylate cycle enzymes by stress as a marker for seedling vigor in sugar beet (*Beta vulgaris*). **Molecular and General Genetics**, v. 269, p. 692-698, 2003.

DÍAZ-LÓPEZ, L.; GIMENO, V.; LIDÓN, V.; SIMÓN, I.; MARTÍNEZ, V.; GARCÍA-SÁNCHEZ, F. The tolerance of *Jatropha curcas* seedlings to NaCl: an ecophysiological analysis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 34-42, 2012.

DIVAKARA, B. N.; UPADHYAYA, H. D.; WANI, S. P. LAXMIPATHI, G. C. L. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. **Applied Energy**, v. 87, p. 732-742, 2010.

DIXON, G. H.; KORNBERG, H. L. Assay methods for key enzymes of the glyoxalate cycle. **Biochemical Journal**, v. 72, p. 3, 1959.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DRUMOND, M. A.; SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.; MARTINS, J. C.; ANJOS, J. B.; EVANGELISTA, M. R. V. Desempenho agrônômico de genótipos de pinhão manso no Semiárido pernambucano. **Ciência Rural**, v. 40, p 44-47, 2010.

EASTMOND, P. J.; GERMAIM, V.; LANGE, P. R.; BRYCE, J. H.; SMITH, S. M.; GRAHAM, I. A. Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 5669-5674, 2000.

EASTMOND, P. J.; GRAHAM, I. A. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. **Trends Plant Science**, v. 6, p. 72-77, 2001.

FAO. **Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-affected Soils**. Rome: FAO Land and Plant Nutrition Management Service, 2005.

FLAGELLA, Z.; GIULIANI, M. M.; ROTUNNO, T.; DI CATERINA, R.; DE CARO, A. Effect of saline water on oil yield and quality of a high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrid. **European Journal of Agronomy**, v. 21, p. 267-272, 2004.

GAINES, T. P.; PARKER, M. B.; GASCHO, G. J. Automated determination of chlorides in soil and plant tissue by sodium nitrate. **Agronomy Journal**, v. 76, p. 371-374, 1984.

GALLÃO, M. I.; DAMASCENO, L. F.; DE BRITO, E. S. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, p. 106-109, 2006.

GALLÃO, M. I.; VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. P.; SOUZA, A. S. N.; DE BRITO, E. S. Reserve mobilisation in mesquite (*Prosopis juliflora*) seed (Leguminosae). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 2012-2018, 2007.

GERLACH, D. **Botanische Microtechnik**. Stuttgart: Georg Thieme, 1984.

GHEYI, H. R. Problema da salinidade na agricultura irrigada. In: OLIVEIRA, T. S.; ASSIS JÚNIOR, R. N.; ROMERO, R. E.; SILVA, J. R. C. (Ed.). **Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido**. Fortaleza: CDS/ UFC, 2000. p. 329-346.

GÓIS, V. A.; TORRES, S. B.; PEREIRA, R. A. Germinação de sementes de maxixe submetidas a estresse salino. **Revista Caatinga**, v.21, p.64-67, 2008.

GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T.; CAMPOS, F. A. P.; ENÉAS-FILHO, J. Effects of salinity *in vivo* and *in vitro* on ribonuclease activity of *Vigna unguiculata* cotyledons during germination. **Physiologia Plantarum**, v. 59, p. 183-188, 1983.

GOMES-FILHO, E.; LIMA, C. R. F. M.; COSTA, J. H.; DA SILVA, A. C. M.; DA GUIA, M. S. L.; DE LACERDA, C. F.; PRISCO, J. T. Cowpea ribonuclease: properties and effect of NaCl-salinity on its activation during seed germination and seedling establishment. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 147-57, 2008.

GONDIM, F. A.; GOMES-FILHO, E.; COSTA, J. H.; ALENCAR, N. L. M.; PRISCO, J. T. Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 56, p. 62-71, 2012.

GOODRUM, J. W.; GELLER, D. P. Influence of fatty acid methyl esters from hydroxylated vegetable oils on diesel fuel lubricity. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 851-855, 2005.

GRAHAM, I. A. Seed storage oil mobilization. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 115-142, 2008.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 149-190, 1980.

GU, K.; YI, C.; TIAN, D.; SANGHA, J. S.; HONG, Y.; YIN, Z. Expression of fatty acid and lipid biosynthetic genes in developing endosperm of *Jatropha curcas*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 47, 2012.

GUAN, B.; ZHOU, D.; ZHANG, H.; TIAN, Y.; JAPHET, W.; WANG, P. Germination response of *Medicago ruthenica* seeds to salinity, alkalinity and temperature. **Journal of Arid Environments**, v. 73, p. 135-138, 2009.

GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**, v. 311, p. 98-99, 2002.

HELLER, J. Physic nut (*Jatropha curcas* L.): promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, 1996. 66p.

HOCK, B.; BEEVERS, H. Development and decline of the glyoxylate-cycle enzymes in watermelon seedlings (*Citrullus vulgaris* Schrad.) and effects of dactinomycin and cycloheximide. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 55, p. 405-414, 1966.

HODGE, J. E.; HOFREITER, B. R. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WILSTER, R.L.; WOLFROM, M.L. (eds.). **Methods in carbohydrates chemistry**. New York: Academic Press, v.1, p.380-394, 1962.

HU, G.; LU, Y.; WEI, D. Fatty acid composition of the seed oil of *Allium tuberosum*. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1630-1632, 2005.

JOLIVET, P.; ROUX, E.; D'ANDREA, S.; DAVANTURE, M.; NEGRONI, L., ZIVY, M.; CHARDOT, T. Protein composition of oil bodies in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 501-509, 2004.

KARMEE, S. K.; MAHESH, P.; RAVI, R.; CHADHA, A. Kinetics study of the base catalyzed transesterification of monoglycerides from Pongamia oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 81, p. 425-430, 2004.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KATWALL, R. P. S.; SONI, P. L. Biofuels: an opportunity for socioeconomic development and cleaner environment. **Indian Forest**, v. 129, p. 939-949, 2003.

KHAN, M. A.; GULZAR, S. Germination responses of *Sporobolus ioclados*: A saline desert grass. **Journal of Arid Environments**, v. 55, p. 453-464, 2003.

KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p.1-10, 2008.

KUMAR, N.; PAMIDIMARR, S. D. V. N.; KAUR, M.; BORICHA, G.; REDDY, M. P. Effects of NaCl on growth, ion accumulation, protein, proline contents and antioxidant enzymes activity in callus cultures of *Jatropha curcas*. **Biology**, v. 63, p. 378-382, 2008.

KUMAR, A.; SHARMA, S.; MISHRA, S. Influence of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and salinity on seedling growth, solute accumulation and mycorrhizal dependence of *Jatropha curcas* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 29, p. 297-306, 2010.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: OEA, 1983. 174 p.

LAVIOLA, B. G.; BHERING, L. L.; MENDONÇA, S.; ALBRECHT, J. C.; ROSADO, T. B.; MARANA, J. C. RIBEIRO, J. A. A. Caracterização morfo-agronômica do banco de germoplasma de pinhão-manso: Resultados do 1º ano de avaliação. **Comunicado Técnico Embrapa Agroenergia**, v. 3, p. 1-8, 2010.

LAVIOLA, B. G.; OLIVEIRA, A. M. C.; BHERING, L. L.; ALVES, A. A.; ROCHA, R. B.; GOMES, B. E. L.; CRUZ, C. D. Estimates of repeatability coefficients and selection gains in *Jatropha* indicate that higher cumulative genetic gains can be obtained by relaxing the degree of certainty in predicting the best families. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 70-76, 2013.

LIM, S.; LEE, K T. Process intensification for biodiesel production from *Jatropha curcas* L. seeds: Supercritical reactive extraction process parameters study. **Applied Energy**, v. 103, p. 712-720, 2013.

LIN, N. F.; TANG, J. Study of the environment evolution and the analysis of causes to land salinization and desertification in Songnen plain. **Quaternary Science Reviews**, v. 25, p. 474-485, 2005.

LIRA, M. A. P.; DANTAS, B. F.; ANDRÉO-SOUZA, Y.; OLIVEIRA, D. A. B.; ARAÚJO, M. N.; LOPES, A. P.; SILVA, F. F. S.; RIBEIRO-REIS, R. C. Influência do estresse salino na germinação de sementes de pinhão-manso. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3., 2008, Salvador. **Energia e ricinoquímica: Resumos**. Salvador: SEAGRI: Embrapa Algodão, 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LIU, H.; LIU, Y. J.; YANG, M. F.; SHEN, S. H. A comparative analysis of embryo and endosperm proteome from seeds of *Jatropha curcas* L. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 51, p. 850-857, 2009.

LOPES, L. S.; GALLAO, M. I.; BERTINI, C. H. C. M. Mobilisation of reserves during germination of *Jatropha* seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p. 371-378, 2013.

LOUREIRO, M. B.; VIRGENS, I. O.; NÚÑEZ, I. A.; VILAS-BOAS, A. C.; TELES, C. A. S.; CASTRO, P. D. A.; DRUMOND, M. A.; DELMONDEZ, R.; FERNANDEZ, L. G. Efeito do estresse hídrico sobre a germinação de sementes Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). *In*: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA E BIODIESEL, 2., Brasília. **Livro de Resumos do Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia e Biodiesel**. Brasília: MCT, 2007.

MACIEL, F. M.; LABERTY, M. A.; OLIVEIRA, N. D.; FELIX, S. P.; SOARES, A. M. S.; VERÍSSIMO, M. A.; MACHADO, O. L. T. A new 2S albumin from *Jatropha curcas* L. seeds and assessment of its allergenic properties. **Peptides**, v. 30, p. 2103-2107, 2009.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.1, p.176-177, 1962.

MAIA, V. **Técnica histológica**. São Paulo: Atheneu, 1979.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, A. S. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201p.

MARQUES, E. C.; FREITAS, V. S.; BEZERRA, M. A.; TARQUÍNIO, J. Efeitos do estresse salino na germinação, emergência e estabelecimento da plântula de cajueiro anão precoce. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 993-999, 2011.

MARQUES, E. C.; FREITAS, P. A. F.; ALENCAR, N. L. M.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Increased Na^+ and Cl^- accumulation induced by NaCl salinity inhibits cotyledonary reserve mobilization and alters the source-sink relationship in establishing dwarf cashew seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v 35, p. 2171-2182, 2013.

MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. Uso potencial e toxidez da torta de pinhão-manso. **Comunicado Técnico Embrapa Agroenergia**, v. 1, p. 1-7, 2009.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.

MUCCIFORA, S.; GUERRANTI, R.; MUZZI, C.; HOPE-ONYEKWERE, N. S.; PAGANI, R.; LEONCINI, R.; BELLANI, L. M. Ultrastructural and biochemical investigations of protein mobilization of *Mucuna pruriens* (L.) DC. cotyledons and embryo axis. **Protoplasma**, v. 239, p. 15-21, 2010.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant Cell Environment**, v. 28, p. 239-250, 2002.

NERY, A. R.; RODRIGUES, L. N.; SILVA, M. B. R.; FERNANDES, P. D.; CHAVES, L. H. G.; CHAVES, J. D. N.; GHEYI, H. R. Crescimento do pinhão-manso irrigado com águas salinas em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, p. 551-558, 2009.

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

PONTES, C. A.; LIMA e BORGES, E. E.; BORGES, G. R. G.; SOARES, C. P. B. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia lucocarpa* (Vogel) J.F. Macbr. (GARAPA) durante a embebição. **Revista Árvore**, v. 26, p.593-601, 2002.

PRITCHARD, S. L.; CHARLTON, W. L.; BAKER, A.; GRAHAM, I. A. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 31, p. 639-647, 2002.

PRISCO, J. T. Alguns aspectos da fisiologia do estresse salino. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 3, p. 85-94, 1980.

PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J. R.; GOMES-FILHO, E. Effect of NaCl on cotyledon starch mobilization during germination of *Vigna unguiculata* (L) Walp seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 4, p. 63-71, 1981.

PURCINO, A.A.; DRUMMOND, O.A. **Pinhão-manso**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1986. 7p.

RAMOLIYA, P. J.; PANDEI, A. N. Effect of salinization of soil on emergence, growth and survival of seedlings of *Cordia rothii*. **Forest Ecology and Management**, v. 176, p. 185-194, 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 906 p.

REALE, L.; RICCI, A.; FERRANTI, F.; TORRICELLI, R.; VENANZONI, R.; FALCINELLI, M. Cytohistological analysis and mobilization of reserves in *Jatropha curcas* L. seed, **Crop Science**, v. 52, p. 830-835, 2012.

ROCHA, A. J.; SOARES, E. L.; COSTA, J. H.; COSTA, W. L. G.; Soares, A. A.; NOGUEIRA, F. C. S.; DOMONT, G. B. Differential expression of cysteine peptidase genes in the inner integument and endosperm of developing seeds of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Plant Science**, v. 213, p. 30-37, 2013.

SÁNCHEZ-LINARES, L.; RUÍZ, M. G.; PONTONES, D. D.; CHÁVEZ, F. G.; ALEJO, V. C.; VILLEGAS, V. Z.; LOAIZA, V. L. Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 4513-26, 2012.

SARAIVA, K. D. C. **Caracterização, análise filogenética e perfil de expressão da família multigenica do fator de alongação α -1 (EF1 α) de soja (*Glycine max* L. Merr.): Detecção de genes normalizadores para qPCR**. 2013. 128 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia molecular), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SATO, S.; HIRAKAWA, H.; ISOBE, S.; FUKAI, E.; WATANABE, A. Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree of *Jatropha curcas* L. **DNA Research**, v. 8, p. 65-76, 2011.

SILVA, B. E. P. B. C.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; GUIMARÃES, S. C.; MENDONÇA, E. A. F. Germinação de sementes de *Amburana acreana* (Ducke) A. C. Sm. submetidas a diferentes condições de temperatura e de estresse hídrico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, p.16-24, 2008.

SILVA, E. N.; SILVEIRA, J. A. G.; FERNANDES, C. R. R.; DUTRA, A. T. B.; ARAGÃO, R. M. Ion uptake and growth of physic nut under different salinity levels. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, p. 240-246, 2009a.

SILVA, E. N.; SILVEIRA, J. A. G.; FERNANDES, C. R. R.; LIMA, C. S.; VIÉGAS, R. A. Contribution of organic and inorganic solutes to osmotic adjustment of physic nut (*Jatropha curcas*) under salinity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 437-445, 2009b.

SILVA, E. N.; RIBEIRO, R. V.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. **Journal Arid of Environment**, v. 74, p. 1130-1137, 2010.

SILVA, E. N.; VIEIRA, S. A.; RIBEIRO, R. V.; PONTE, L. F. A.; FERREIRA-SILVA, S. L.; SILVEIRA, J. A. G. Contrasting physiological responses of *Jatropha curcas* plants to single and combined stresses of salinity and heat. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, p. 159-169, 2012.

SMAOUI, A, CHERIF, A. Changes in molecular species of triacylglycerols in developing cotton seeds under salt stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, p. 902-905, 2000.

SOLTANI, A.; GHOLIPOOR, M.; ZEINALI, E. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 55, p. 195-200, 2006.

SOUZA, L. A. **Sementes e plântulas: germinação, estrutura e adaptação**, 1. ed. Maringá: Toda palavra, 2009. 280 p.

SUDA, C. N. K.; GIORGINI, J. F. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 226-245, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2013. 954 p.

TAPANES, N. C. O.; ARANDA, D. A. G.; CARNEIRO, J. W. M.; ANTUNES, O. A. C. Transesterification of *Jatropha curcas* oil glycerides: theoretical and experimental studies of biodiesel reaction. **Fuel**, v. 87, p. 2286-2295, 2008.

TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Informe Agropecuário**, v.26, p. 18-27, 2005.

VANDESOMPELE, J.; PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-Step sybr green real-time pcr. **Analytical Biochemistry**, v. 303, p. 95-98, 2002.

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with xylydine ponceau 2R. **Analytical Histochemistry**, v. 15. p. 289-296, 1970.

VIDAL, B. C. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cellular and Molecular Biology**, v. 22, p. 45-64, 1977.

VOIGT, E. L.; ALMEIDA, T. A.; CHAGAS, R. M.; PONTE, L. F. A.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Source-sink regulation of cotyledonary reserve mobilization during cashew (*Anacardium occidentale*) seedling establishment under NaCl salinity. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 80-89, 2009.

WATSON, M.L.. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysical and Biochemistry**. Cytology, v.4, p. 475-478. 1958.

WEN, M.; WANG, H.; XIA, Z.; MEILING, Z.; LU, C.; WANG, W. Development of est-ssr and genomic-ssr markers to assess genetic diversity in *Jatropha curcas* L. **BMC Research Notes**, v. 42, p. 3-8, 2010.

WINKLER, U. R.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 663-670, 1979.

YANG, M. F.; LIU, Y. J.; LIU, Y.; CHEN, H.; CHEN, F.; SHEN, S. H. Proteomic analysis of oil mobilization in seed germination and post-germination development of *Jatropha curcas*. **Journal Proteome Research**, v. 8, pp. 1441-1451, 2009.

YEILAGHI, H.; ARZANI, A.; GHADERIAN, M.; FOTOVAT, R.; FEIZI, M.; POURDA, S. S. Effect of salinity on seed oil content and fatty acid composition of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes. **Food Chemistry**, v. 130, p. 618-625, 2012.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino acids with ninhydrin. **The Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

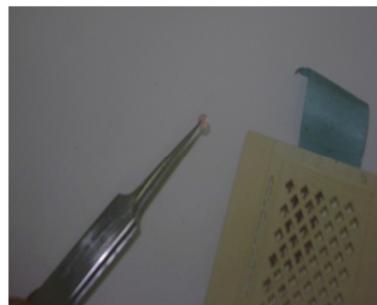
ZHU, J. K. Plant salt tolerance. **Trends Plant Science**, v. 6, p. 66-71, 2001.

ZHU, J.K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 441-445, 2003.

APÊNDICE A – IMAGENS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO



Ultramicrotomo LKB



Telas para cortes ultrafinos



Microscópio eletrônico de transmissão do Laboratório de Microscopia eletrônica da Universidade de Campinas (Zeiss, Leo 906).



APÊNDICE B – MICROSCOPIA DE LUZ X MICROSCOPIA CONFOCAL

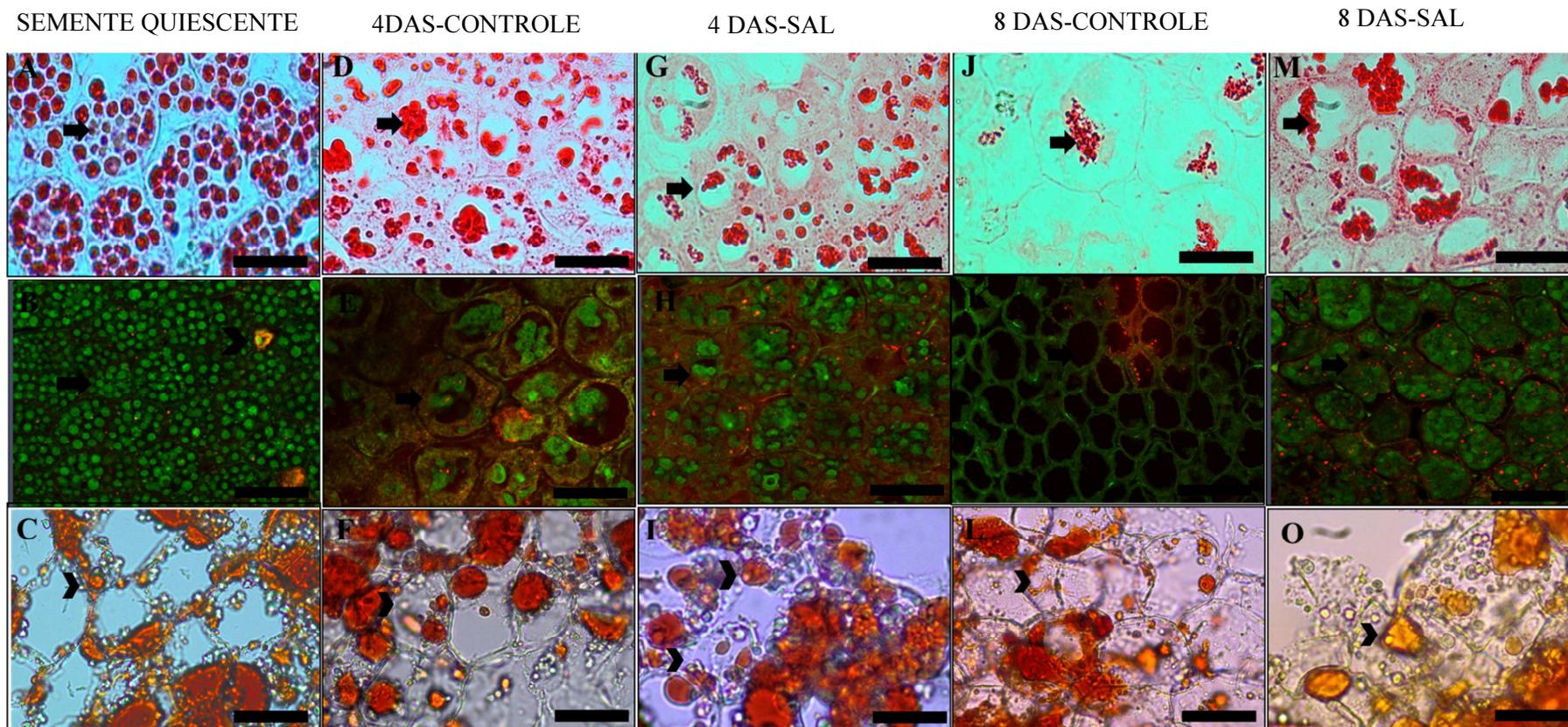


Figura 25. Micrografias de endospermas de sementes de *J. curcas*: quiescente (A-C); 4 dias após a sementeira (DAS), no controle (D-F) e estresse salino (G-I); 8 DAS no controle (J-L) e 8 DAS (M-O) no estresse salino. Seções coradas com xylidine Ponceau-XP (A, D, G, J, M), mostrando corpos proteicos (➔); análise confocal confirmando XP (B, E, H, K, N); seções coradas com Sudan IV (C, F, I, L, O) revelando corpos lipídicos (➤). A barra representa 50 µm.

ANEXO A- ASPECTOS BOTÂNICOS DO PINHÃO-MANSO

FONTE: Sindicato Rural de Ouro Preto- <http://www.sindrof.com.br/pinhao-manso/>- Acesso em 19/02/2014