

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

DEBORAH MOURA REBOUÇAS

**EFEITO DO ÁCIDO ABSCÍSICO NAS BOMBAS DE PRÓTONS VACUOLARES E
ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM *Vigna unguiculata* (L.) Walp**

FORTALEZA-CEARÁ

2011

DEBORAH MOURA REBOUÇAS

EFEITO DO ÁCIDO ABCÍSIKO NAS BOMBAS DE PRÓTONS VACUOLARES E
ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM *Vigna unguiculata* (L.) Walp

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal. Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Dirce Fernandes de Melo

FORTALEZA-CEARÁ

2011

DEBORAH MOURA REBOUÇAS

EFEITO DO ÁCIDO ABCSÍCO NAS BOMBAS DE PRÓTONS VACUOLARES E
ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM *Vigna unguiculata* (L.) Walp

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Dissertação aprovada em: 16/02/2011

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Dirce Fernandes de Melo (Orientadora)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará -UFC

Prof^º. Dr. José Hélio Costa
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^ª. Dr^ª. Alana Cecília de Menezes Sobreira
Faculdade de Educação, Ciências e Letras de Iguatu – FECLI
Universidade Estadual do Ceará - UECE

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradecer é um gesto de grandeza que se deve ter para com as pessoas que, de algum modo, se propõem a ajudar, merecendo, assim, ser reconhecidas. Portanto para demonstrar o meu reconhecimento pela ajuda e apoio recebidos nesta trajetória de dois anos de muito trabalho e dedicação, aqui ofereço os meus agradecimentos.

Os experimentos realizaram-se no Laboratório de Bioenergética do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, local este em que fui graciosamente acolhida por minha querida orientadora, professora Dirce Fernandes de Melo, a quem venho primeiramente agradecer por tudo o que fez e faz por mim, pelos incentivos, elogios, críticas, apoio e conversas, sendo minha primeira e única orientadora.

Em segundo lugar venho agradecer ao meu co-orientador e amigo Yuri Maia por me ensinar muito do que sei no que diz respeito ao assunto tratado neste trabalho, por me assessorar no desenvolvimento de gráficos e nas estatísticas, por me ensinar as técnicas laboratoriais e, além disso, por ‘colocar a mão na massa’ juntamente comigo mesmo debaixo de sol. Enfim, por ele ser parte fundamental e indispensável neste trabalho, pois sem ele, eu não conseguiria dar prosseguimento ao mesmo.

Agradeço também em especial a minha amiga, professora Alana Cecília, por todos os seus ensinamentos, seu apoio e sua amizade desde a minha Iniciação Científica até os dias de hoje. Muito do que sou e do que sei eu também devo a ela. Agradeço também pela contribuição dada com sua participação na minha banca de defesa.

Agradeço a minha amiga Caroline Almada (Carol), atualmente mestranda em Bioquímica por todo o seu empenho em me ajudar nos experimentos durante o seu período de Iniciação Científica. Não só por isso... Também pela companhia nos almoços, pelas conversas todos os dias e pelas atividades extra-laboratoriais que tivemos juntamente com sua irmã e também minha amiga Carine Almada. Mas o melhor de tudo nesse período foi carregarmos juntas bacias cheias de areia até a Casa de Vegetação, além de lavar e autoclavar essas areias utilizadas nas plantações, pois nem foi muito cansativo. Não foi, Carol?

Agradeço ao professor José Hélio Costa pela participação na banca e por estar disposto a contribuir com seus ensinamentos durante o período do meu Mestrado.

Agradeço também em especial a minha colega de laboratório Neuza Félix (Neuzinha) por muito contribuir em me assessorar nos experimentos com as enzimas antioxidantes estudadas neste trabalho.

Agradeço à professora Luciana Maia por seus ensinamentos e pela sua disponibilidade em ajudar.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por me conceder uma bolsa de Mestrado.

Agradeço a minha família: meu pai Joselino, minha mãe Rosalba, minha irmã Bruna e meu irmão Roberto pelo apoio e paciência para comigo.

Agradeço a todos os meus outros colegas de laboratório pela amizade, companheirismo e apoio. São eles: Ana Beatriz, Andresiane, Bárbara, Beatriz, Camila, Carine, Edson, Erika, Flávio, Geórgia, Iara, João Henrique, Khaterine, Marcela, Mirele, Natália, Nila, Pedro e Welves.

Agradeço ao professor Enéas Gomes por disponibilizar a Casa de Vegetação e o equipamento denominado IRGA para a condução dos experimentos.

Agradeço ao professor Joaquim Enéas por disponibilizar o liofilizador.

Agradeço à professora Raquel Alcântara por disponibilizar as centrífugas refrigeradas.

Agradeço aos colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela amizade criada a partir do momento em que eu comecei a fazer parte desse ambiente e por me ajudarem de alguma forma na realização deste trabalho.

Finalmente agradeço a Deus por permitir que este trabalho se concretizasse.

RESUMO

O ácido abscísico (ABA) é um fitohormônio que desempenha papéis críticos na regulação das respostas das plantas ao crescimento e desenvolvimento. O vacúolo de plantas superiores é uma organela que ocupa a maior parte da célula. A condição de acidez é mantida por duas bombas de prótons distintas, V-ATPase e V-PPase. Sabe-se que estas bombas de prótons desempenham um papel essencial nas respostas das plantas às mudanças ambientais. O gradiente eletroquímico promovido por essas enzimas é a força motriz para o acúmulo de íons e outros solutos no vacúolo, sendo importante para manter a homeostase citosólica de íons e o metabolismo celular. As enzimas antioxidantes constituem um sistema de defesa contra as espécies reativas de oxigênio, que podem provocar danos ao desenvolvimento das plantas. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do ácido abscísico nos parâmetros de crescimento e fisiológicos, bem como o efeito na atividade hidrolítica e na expressão de transcritos das bombas de prótons vacuolares e na atividade de enzimas antioxidantes de plantas de *Vigna unguiculata*. As sementes de *V. unguiculata* foram germinadas em areia, onde cresceram por 15 dias, com aplicação de solução nutritiva de Hoagland na ausência (controle) ou presença de ABA 0,1 μM no terceiro, no sétimo e no décimo dias após a germinação. Os efeitos do ácido abscísico (ABA) sobre o crescimento, a condutância estomática, a transpiração, a fotossíntese, a concentração interna de CO_2 , a atividade e a expressão da subunidade A da V-ATPase e da V-PPase e a atividade de enzimas antioxidantes de *Vigna unguiculata* foram analisados. ABA aumentou o crescimento das plantas, mas não afetou os parâmetros fisiológicos; induziu um aumento na atividade hidrolítica da V-ATPase em folhas e da V-PPase em raízes; aumentou os transcritos de *VuVHA-A* e de *VuVHP* em folhas e diminuiu os transcritos de *VuVHA-A* em raízes e, por fim, causou aumento na atividade da catalase de folhas e de raízes. Esses resultados sugerem que o ácido abscísico regula a atividade e a expressão dos genes das bombas de prótons vacuolares, bem como as atividades de enzimas antioxidantes, sendo portanto importantes efetores que regulam o desenvolvimento de plantas de *V. unguiculata*.

Palavras-chave: Ácido Abscísico. Enzimas Antioxidantes. V-ATPase. *Vigna unguiculata* (L.) Walp. V-PPase.

ABSTRACT

Abscisic acid (ABA) is a phytohormone that plays critical roles in regulating plant responses to growth and development. The vacuole of higher plants is an organelle that occupies a larger part of the cell. The acidic condition is maintained by two distinct proton pumps, V-ATPase and V-PPase. It is known these proton pumps play essential roles in plant responses to environmental changes. The electrochemical gradient promoted by these enzymes is the driving force for the accumulation of ions and other solutes in the vacuole, being important to maintain cytosolic ion homeostasis and cellular metabolism. Antioxidant enzymes constitute a defense system against reactive oxygen species, which can cause damage to plant development. The aim of this study was to study the effect of the abscisic acid in the growth and physiological parameters, as well as the effect on vacuolar proton pumps and antioxidant enzymes (SOD, CAT and APX) from *Vigna unguiculata* cv. Pitiuba. The seeds of *V. unguiculata* were germinated in sand and grown for 15 days, with application of Hoagland solution in the absence (control) or presence of 0.1 μM ABA in the third, seventh and tenth days after germination. The effects of the abscisic acid (ABA) on the growth, stomatal conductance, transpiration, photosynthesis, internal CO_2 concentration, V-ATPase subunit A and V-PPase activities and expression and antioxidant enzymes activities of *Vigna unguiculata* were analyzed. ABA increased the plants growth but did not affect the physiological parameters; induced an increase on V-ATPase hydrolytic activity in leaves and on V-PPase in roots; ABA increased the transcripts of *VuVHA-A* and *VuVHP* in leaves and decreased the *VuVHA-A* transcripts in roots; caused increase in the leaves and roots catalase activity. These results suggest that the abscisic acid regulate the activity and the genes expression of the vacuolar proton pumps, as well as the antioxidant enzymes activity, being thus important effectors that regulate the development of *V. unguiculata* plants.

Keywords: Abscisic Acid. Antioxidant Enzymes. V-ATPase. *Vigna unguiculata* (L.) Walp. V-PPase.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Célula vegetal	20
FIGURA 2. Modelo esquemático de V-ATPase de planta	22
FIGURA 3. Modelo esquemático da V-PPase de planta	26
FIGURA 4: Crescimento de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> cv. Pitiúba	43
FIGURA 5: Efeito do ácido abscísico (ABA) sobre o peso fresco (a), peso seco (b), área foliar (c) e comprimento (d) em plantas de <i>Vigna unguiculata</i> cv. Pitiúba	44
FIGURA 6: Efeito do ácido abscísico (ABA) na condutância estomática (a), na transpiração (b), na fotossíntese (c) e na concentração interna de CO ₂ (d) em plantas de <i>Vigna unguiculata</i> cv. Pitiúba	45
FIGURA 7: Efeito do ácido abscísico (ABA) na atividade hidrolítica da V-ATPase (a) e da V-PPase (b) no extrato total de folhas e de raízes de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> cv. Pitiúba	46
FIGURA 8: Análise de transcritos de <i>VuVHA-A</i> e de <i>VuVHP</i> em folhas e em raízes de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> cv. Pitiúba	48
FIGURA 9: Efeito do ácido abscísico (ABA) na atividade da superóxido dismutase (a), da catalase (b) e da peroxidase do ascorbato (c) no extrato de enzimas antioxidantes de folhas e de raízes de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> cv. Pitiúba	49

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AAO: Aldeído Abscísico Oxigenase

ABA: Ácido Abscísico

APX: Peroxidase do Ascorbato

ATP: Adenosina Trifosfato

BCIP: Fosfato de p-Toluidina-5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato

BSA: Albumina Sérica Bovina

BTP: Bis-Tris-Propano:(1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino)-propano)

CAT: Catalase

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético

EGTA: Ácido Etileno Glicol-Bis (B-Aminoetil Éter). N, N, N', N'-Tetra-Acético

MOPS: Ácido 3-(N-Morfolino) Propano Sulfônico

NBT: Nitro-Blue Tetrazolium

NCED: Dioxigenase 9-Cisepoxicarotenoide

PBS: Phosphate Buffered Saline

PMSF: Fluoreto de Fenilmetila-sulfonila

PPi: Pirofosfato Inorgânico

PVP 40: Polivinil Pirrolidona 40.000g/mol

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SOD: Superóxido Dismutase

V₀: Domínio integral de membrana da V-ATPase

V₁: Domínio periférico de membrana da V-ATPase

V-ATPase: ATPase Vacuolar

V-PPase: Pirofosfatase Vacuolar

ZEP: Zeaxantina Epoxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp – feijão-de-corda	14
2.2 Fitohormônios	15
2.2.1 Ácido abscísico	16
2.3 O vacúolo	19
2.3.1 Caracterização da V-ATPase	21
2.3.2 Caracterização da V-PPase	25
2.4 Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Material vegetal	32
4.2 Metodologia	32
4.2.1 Condições de crescimento	32
4.2.2 Parâmetros de crescimento	33
4.2.3 Parâmetros fisiológicos	33
4.2.4 Extração de proteínas solúveis	33
4.2.5 Determinação de proteínas	34
4.2.6 Atividade de hidrólise da V-ATPase e da V-PPase	34

4.2.7 Isolamento de RNA total	36
4.2.7.1 RT-PCR	37
4.2.7.2 Eletroforese do cDNA amplificado	39
4.2.8 Atividade de enzimas antioxidantes	39
4.2.8.1 Preparação do extrato	39
4.2.8.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD) (E.C 1.15.1.1)	40
4.2.8.3 Atividade da catalase (CAT) (E.C 1.11.1.6)	40
4.2.8.4 Atividade da ascorbato peroxidase (APX) (E.C 1.11.1.11)	40
4.2.9 Análises estatísticas	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Análise dos parâmetros de crescimento	42
5.2 Análise dos parâmetros fisiológicos	42
5.3 Avaliação da atividade hidrolítica da V-ATPase e da V-PPase	42
5.4 Avaliação da expressão de genes	47
5.5 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes	47
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

O feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é utilizado por populações em todo o Brasil, principalmente na região Nordeste, como importante fonte de alimento (SILVA, 2005).

As plantas são organismos multicelulares complexos, necessitando para o seu desenvolvimento ordenado um eficiente meio de comunicação. Os principais meios de comunicação intercelular são os hormônios, que são compostos orgânicos, não nutrientes, de ocorrência natural, produzidos nas plantas em baixas concentrações, que promovem, inibem ou modificam processos fisiológicos e morfológicos nos vegetais. Existem 5 principais classes de fitohormônios, que são: auxinas (alongamento celular e dominância apical), giberelinas (germinação de sementes), citocininas (maturação de cloroplastos), etileno (amadurecimento de frutos) e ácido abscísico (hormônio do estresse) (TAIZ; ZEIGER, 2002).

O ácido abscísico é um fitohormônio que desempenha papéis críticos na regulação das respostas das plantas ao crescimento e desenvolvimento, tendo como funções principais: desenvolvimento de sementes; aumento da condutividade hidráulica, principalmente devido a uma maior absorção de água pela raiz e senescência foliar (atuando nos estágios iniciais). Em casos de estresse hídrico ou salino, sua concentração endógena é aumentada fazendo com que haja o crescimento da raiz, para a busca de mais água nos solos mais profundos; na redução da parte aérea, para evitar gastos energéticos; no fechamento estomático para uma consequente redução da transpiração, evitando mais perdas de água (TAIZ; ZEIGER, 2002).

O vacúolo das células vegetais é uma das organelas mais importantes, ocupando quase 90% da célula, tendo como funções a expansão celular, uma vez que a entrada de água no vacúolo gera uma pressão de turgor que expande a célula e, conseqüentemente, promove o crescimento da planta; o acúmulo e armazenamento de metabólitos em seu interior; a homeostase de íons presentes no citosol ao regular suas concentrações; a defesa contra a invasão de patógenos, liberando substâncias tóxicas para a proteção da célula e, a hidrólise e reciclagem de compostos celulares, já que possui enzimas hidrolíticas em seu interior (MAESHIMA, 1996). Portanto, o vacúolo é uma organela indispensável para o estudo no crescimento e no desenvolvimento da planta.

As bombas de prótons vacuolares, a V-ATPase e a V-PPase, têm sido mencionadas como exercendo papel fundamental nos mecanismos de ajustamento das plantas a estresses variados. Essas bombas, ao funcionarem como transportadores ativos primários, constituem-se em sistemas enzimáticos importantes para o metabolismo das plantas. Essas

enzimas são responsáveis pela geração de um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana vacuolar (tonoplasto). O gradiente de prótons gerado pelas bombas é usado por outros sistemas de transporte do tonoplasto como contra-transporte H^+ /substrato, permitindo que processos fundamentais para o desenvolvimento das plantas sejam realizados (MAESHIMA, 2001).

Crescentes evidências indicam que o ABA pode estar relacionado ao estresse oxidativo nas células vegetais. Jiang; Zhang (2002) relataram que o ABA pode provocar um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, como O^{2-} e H_2O_2 , que quando em excesso podem ser prejudiciais às plantas, o que leva ao aumento da regulação do sistema de defesa antioxidante, que podem ser: a enzima superóxido dismutase, que dismuta o radical superóxido até peróxido de hidrogênio; a catalase e a ascorbato peroxidase, que decompõem o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (MITTLER, 2002), sendo necessário o estudo da ação do ABA nas enzimas antioxidantes.

Primeiramente, foi realizado um estudo do efeito do ABA no crescimento e nos parâmetros fisiológicos das plantas de feijão, seguido de uma análise das bombas de prótons vacuolares em termos de atividade e de expressão gênica a fim de se conhecer os mecanismos de regulação dessas enzimas quando expostas ao ABA. Por último, analisou-se a atividade de enzimas antioxidantes a fim de saber se essas iriam atuar na defesa contra os efeitos deletérios do ABA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Vigna unguiculata* (L.) Walp - Feijão-de-corda

O gênero *Vigna*, Fabaceae, anteriormente denominado Leguminosae, é composto de mais de 200 espécies que são nativas de regiões quentes em todos os continentes (FERY, 2002). A espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp é vulgarmente conhecida como feijão-de-corda, feijão fradinho, feijão macassar e feijão caupi. É uma dicotiledônea que pertence à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolinae e gênero *Vigna* (VERCOURT, 1970).

A localização precisa do centro de origem do feijão-de-corda ainda não está determinada. Baseado nas variações tanto morfológicas quanto genéticas, em relação à distribuição geográfica e ao número de variedades selvagens, bem como as suas características primitivas, acredita-se que a mais primitiva das espécies de *Vigna unguiculata* (L.) Walp selvagem tenha surgido no sul da África. Tal espécie foi difundida por outras partes da África, Europa e Índia e somente trazida para as Américas tropicais por volta do ano de 1700 pelos espanhóis juntamente com o comércio de escravos (SINGH; MOHAN; DASHIELL, 1997).

O feijão-caupi tem destaque na Região Nordeste Brasileira, sendo a principal cultura de subsistência no sertão semi-árido (SILVA, 2005). No Brasil, na 1ª safra de feijão para 2011, aguarda-se uma área a ser colhida de 2,3 milhões de hectares e uma produção de 2,0 milhões de toneladas, menores em 8,0% e 7,4%, respectivamente, em fevereiro comparativamente a janeiro. Dentre os fatores considerados como principais responsáveis pelos decréscimos, é apontada a tomada de decisão do produtor rural que optou pelo plantio de outras culturas como a soja, bem como pelo excesso de chuvas verificado na colheita, que afetou as lavouras em importantes centros produtores como Paraná, Minas Gerais e Goiás. Para a 2ª safra de feijão, a área a ser colhida de 1.353.027 hectares e a produção esperada de 1.400.032 toneladas, frente a janeiro, são maiores em 3,8% e 15,4%, respectivamente. Na análise desses números deve-se levar em consideração que, na Região Nordeste, onde se prevê um ganho de produção de 40,1%, os dados, para a maioria destas Unidades da Federação informantes, entre as quais se encontra a Bahia, são projeções. Por outro lado, na Região Sudeste houve decréscimos na área (-7,0%) e na produção (-0,7%) causados pelas modificações nos dados de Minas Gerais (-9,0% na área e -1,2% na produção), onde o veranico prejudicou o preparo de solo, atrasando o plantio e desestimulando produtores. No

Paraná, maior produtor nacional, a área a ser colhida de 185.590 ha indica um crescimento de 1,3% e a produção esperada de 333.449 t cresce 21,8% frente à informação de janeiro de 2011, principalmente, em função do ganho de 20,2% no rendimento médio avaliado em fevereiro do mesmo ano, como sendo de 1.797 kg/há (IBGE, 2011).

As leguminosas contêm relativamente grandes quantidades de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais e constituem uma fonte protéica primária para muitas populações no mundo, por razões culturais e econômicas. Sua composição química varia com a cultivar, com o solo e com as condições climáticas da região (IQBAL et al., 2006). O feijão-caupi é uma excelente fonte de proteínas (23-25% em média) e apresenta todos os aminoácidos essenciais, cultivado principalmente para a produção de grãos, secos ou verdes, visando o consumo humano in natura, na forma de conserva ou desidratado (DUTRA; TEÓFILO, 2006).

O feijão-de-corda é essencial no apoio à produção animal e à produção de cereais em regiões semi-áridas, servindo como forragem, esteio, protegendo contra a erosão e também na eliminação de certas plantas parasitas. Outra importante característica é a de promover a fixação de nitrogênio através da simbiose com a bactéria de nódulo (*Bradyrhizobium* sp.). Já foi visto que o plantio do feijão-de-corda além de manter a reserva de nitrogênio no solo também é capaz de aumentá-la (SINGH; MOHAN; DASHIELL, 1997).

2.2 Fitohormônios

As plantas são organismos multicelulares complexos, necessitando para o seu desenvolvimento ordenado um eficiente meio de comunicação entre os órgãos, tecidos e células via simplasto e/ou apoplasto. Para coordenar suas atividades, as células da planta devem ser capazes de se comunicar, frequentemente, a diferentes distâncias (entre órgãos, por exemplo). Os principais meios de comunicação intercelular são os hormônios, mensageiros químicos primários que carregam a informação entre células e, desta forma, coordenam o seu crescimento e desenvolvimento (TAIZ; ZEIGER, 2002). Eles influenciam processos fisiológicos e são ativos em baixas concentrações (DAVIES, 1995).

O termo “hormônio” deriva do grego e significa “estímulo”. Seu uso original em Fisiologia Vegetal derivou do conceito de hormônio animal, envolvendo um local específico de síntese, transporte pelo sistema vascular até um tecido alvo, e o controle de uma resposta fisiológica no tecido alvo através da concentração do hormônio (TREWAVAS; CLELAND, 1983).

A primeira evidência de um hormônio vegetal ocorreu no final do século XIX a partir dos experimentos de Charles e Francis Darwin, publicados no livro “O poder do movimento nas plantas”, onde eles verificaram o fototropismo em coleóptilos de plântulas de alpiste (*Phalaris canariensis*). Esses experimentos indicaram que algum tipo de sinal era produzido no ápice e se deslocava até a zona de crescimento, provocando o crescimento mais rápido do lado sombreado do que do lado iluminado (TAIZ; ZEIGER, 2002). Em 1926, esse mensageiro foi isolado em tecidos vegetais, onde foi permitido que ele se difundisse através de blocos de ágar, os quais retiveram então uma atividade promotora de crescimento. A partir daí os hormônios vegetais foram sendo descobertos e estudados (CHOLODNY, 1926; WENT, 1926).

Estudos realizados durante o último século têm mostrado que o desenvolvimento da planta é regulado por cinco principais classes de hormônios: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico. Moléculas receptoras específicas correspondentes para cada um dos hormônios de planta estão presentes nas células-alvo (onde o hormônio vai atuar) e a ligação hormônio-receptor parece desencadear as respostas. Dentre estas classes de hormônios, algumas promovem enquanto outras inibem vários aspectos do desenvolvimento da planta, podendo as mesmas atuar sozinhas ou em conjunto (TAIZ; ZEIGER, 2002).

Vários estudos têm sido realizados sobre o uso de fitohormônios para investigar seus efeitos em estimular ou inibir a atividade enzimática (BARKLA et al, 1999; FUKUDA; TANAKA, 2006; JANICKA-RUSSAK; KLOBUS, 2007; JIANG; ZHANG, 2002; OZOLINA; PRADEDOVA; SALYAEV, 1996), a expressão de proteínas e de transcritos (FUKUDA; TANAKA, 2006; SHI; ZHU, 2002; YU et al., 2006) e o desenvolvimento de órgãos (ALBACETE et al., 2008; LI et al., 2005).

2.2.1 Ácido abscísico

O ácido abscísico (ABA) é um sesquiterpeno sintetizado a partir da oxidação de zeaxantina e anteroxantina à violaxantina pela enzima zeaxantina epoxidase (ZEP), etapa que ocorre nos plastídios. A violaxantina é convertida em 9-cis epoxicarotenóide (9-cis noxantina) e oxidada pela dioxigenase 9-cisepoxicarotenóide (NCED) à xantonina. A xantonina é convertida a aldeído abscísico pela xantonina oxidase que é oxidada para formação do ABA pela enzima aldeído abscísico oxigenase (AAO) no citosol (TAYLOR; BURBIDGE; THOMPSON, 2000; XIONG; ZHU, 2003).

Ele se apresenta na forma não dissociada (protonado- ABAH) ou na forma inativa conjugada (ácido abscísico glicose éster) (SAUTER; DIETZ; HARTUNG, 2002; SAUTER; HARTUNG, 2000). A forma protonada se difunde pela membrana plasmática para o interior da célula deixando de estar disponível no apoplasto para que ocorra o fechamento estomático, uma vez que o local de ação do ABA está na superfície externa das células (HARTUNG, 1983). Durante o estresse osmótico, o pH da seiva do xilema torna-se mais alcalino favorecendo a produção da forma dissociada do ABA que não consegue atravessar as membranas, favorecendo, portanto a redução de sua entrada nas células e acúmulo no apoplasto no qual mais células-guarda são atingidas (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2008).

O fitohormônio ácido abscísico (ABA) tem sido implicado no controle de uma ampla gama de processos fisiológicos essenciais, incluindo o desenvolvimento de sementes e a adaptação das plantas a estresses ambientais (NAVARRO-AVIÑÓ; BENNETT, 2005). Esse hormônio parece suavizar o efeito inibitório de NaCl sobre a fotossíntese e a translocação de assimilados (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2008). É um dos responsáveis pela alteração de genes induzidos pelo estresse salino, sendo considerado o hormônio mais intimamente ligado aos estresses (SIDDIQUI et al., 1998). Na célula, ele controla a síntese de enzimas que atuam na proteção da célula sob severos estresses, como a desidratação (LI et al., 2002) ou calor (RIZHISKY; LIANG; MITTLER, 2002), mas também em muitos outros processos, tais como a transferência de água (PARENT et al., 2009). Nos órgãos, o ABA é reconhecido como tendo um papel fundamental no movimento dos estômatos (CHRISTMANN et al., 2007) e na condutividade hidráulica dos tecidos (PARENT et al., 2009). Na planta inteira, o ABA tem sido considerado como um candidato para a comunicação caule-raiz durante o estresse hídrico ou salino (DAVIES; ZHANG, 1991).

Níveis endógenos de ABA foram mostrados elevados quando as plantas estão estressadas com a seca e / ou NaCl, e a aplicação de ABA em plantas não estressadas resulta na indução de inúmeras atividades relacionadas ao déficit de água (BARKLA et al., 1999). Um deles é o desencadeamento do fechamento dos estômatos para reduzir a perda de água transpiracional por modulações pós-traducionais de canais de íons nas células-guarda (GRABOV; BLATT, 1998). Durante o déficit osmótico, as concentrações de ABA aumentam em raízes e folhas em consequência de fatores de transcrição que induzem o aumento da expressão de vários genes relacionados à síntese de enzimas da rota de produção de ABA como o gene que sintetiza NCED e AAO (THOMPSON et al., 2000). Durante o estresse osmótico, a biossíntese de ABA é induzida pela perda da turgescência, na raiz ou nas células-

guarda e o transporte é realizado pelo xilema da raiz para as folhas, e pelo floema do local de síntese nas folhas para outras regiões deste órgão (DAVIES; ZHANG, 1991; LIANG; ZHANG; WONG, 1996; SAUTER; DIETZ; HARTUNG, 2002). Barkla et al. (1999) investigaram o papel de ABA em mediar os aumentos nas atividades da V-ATPase e do Na⁺/H⁺ antiporte induzidos por estresse com NaCl em *Mesembryanthemum crystallinum*, levando ao sequestro de Na⁺ vacuolar. O papel de ABA na modificação da atividade das bombas de prótons em raízes de pepino estressadas por 24 h com 200 mmol/dm³ NaCl foi investigada por Janicka-Russak; Klobus (2007) e concluíram que sob condições de estresse salino, o papel da ação de ABA devido à salinidade na indução da PM-H⁺-ATPase pode ser a nível de expressão gênica.

Crescentes evidências indicam que um modo de ação de ABA pode estar relacionado com o seu papel no estresse oxidativo nas células vegetais (JIANG; ZHANG, 2002). Tem sido documentado que ABA pode provocar um aumento da geração de O²⁻ (JIANG; ZHANG, 2001) e H₂O₂ (GUAN; SCANDALIOS, 2000; JIANG; ZHANG, 2001), induzindo a expressão de Cu, Zn- SOD (SAKAMOTO et al., 1995), Mn-SOD (BUENO et al., 1998; ZHU; SCANDALIOS, 1998), CAT (GUAN; SCANDALIOS, 1998; WILLIAMSON; SCANDALIOS, 1992) e a atividade de SOD, CAT, guaiacol peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR) (ANDERSON et al., 1994; BELLAIRE et al., 2000; BUENO et al., 1998). Estudos prévios mostraram que cálcio-calmodulina (CaM), NADPH oxidase e H₂O₂ são requeridos pelo ABA para induzir o aumento da atividade de enzimas antioxidantes (HU et al., 2005; HU et al., 2007; JIANG; ZHANG, 2001; JIANG; ZHANG, 2002; ZHANG et al., 2006).

As plantas mutantes (ou deficientes) na produção de ABA germinam precocemente e possuem o desenvolvimento vegetal mais lento (NAGEL; KONINGS; LAMBERS, 1994; SPOLLEN et al., 2000; TAL, 1966). As folhas possuem tamanho reduzido e apresentam epinastia, explicada pela alta concentração de etileno (SHARP; LENOBLE, 2002; SPOLLEN et al., 2000). O mutante *sitiens* possui uma quantidade maior de estômatos e estes permanecem abertos mesmo no escuro ou após o tratamento com acetato de fenilmercúrio, uma substância que causa em plantas normais o fechamento estomático. Portanto, possuem alta condutância estomática e altas taxas de transpiração por área foliar (TAL, 1966). O conteúdo relativo de água nas folhas, o turgor celular e a condutância hidráulica são reduzidos em comparação a planta silvestre (NAGEL et al., 1994; TAL, 1966).

2.3 O vacúolo

O vacúolo (Figura 1) é a maior organela da maioria das células vegetais, podendo compreender mais de 90% do espaço intracelular de uma célula madura. O vacúolo de células vegetais contém a maior parte dos íons orgânicos e de metabólitos que geram uma pressão osmótica levando ao acúmulo de água no seu interior e facilitando a expansão celular (TAIZ; ZEIGER, 2002). Além do papel do vacúolo na expansão celular e conseqüente crescimento das células vegetais, ele exerce outras importantes funções, tais como:

1. acúmulo e armazenamento de metabólitos como, por exemplo, açúcares, proteínas, ácidos orgânicos e nutrientes temporários (MAESHIMA et al., 1996);
2. regulação das concentrações citosólicas de íons inorgânicos como nitrato e Ca^{2+} e sua redistribuição para o citosol de acordo com as necessidades celulares, sendo essa organela considerada um dispositivo homeostático (MAESHIMA et al., 1996);
3. compartimentalização de substâncias tóxicas (glicosídeos cianogênicos e alcalóides) que podem ser liberadas para o citoplasma quando a planta sofre injúria ou ataque por insetos ou outros animais (MAESHIMA et al., 1996);
4. hidrólise e reciclagem de compostos celulares pela ação de enzimas presentes no seu interior (proteases, ribonucleases, fosfodiesterase, glicosidades, fitases e fosfatases alcalinas) (MAESHIMA et al., 1996).

A membrana vacuolar, também denominada de tonoplasto, possui uma estrutura básica comum a todas as membranas celulares, consistindo de uma bicamada lipídica contínua nas quais proteínas são inseridas. Nela estão localizados os sistemas de transporte de uma variedade de substâncias (sistemas primários e secundários), sendo dessa forma considerada uma membrana funcional e altamente organizada (MAESHIMA, 2001). Os sistemas primários são capazes de gerar um gradiente eletroquímico ao transportar íons contra um gradiente de concentração utilizando-se da energia liberada na quebra das ligações covalentes de moléculas ricas em energia como ATP e PPI. Já os sistemas secundários transportam íons e substâncias através da membrana sem envolver a quebra de ligações covalentes, mas dependem do gradiente eletroquímico de H^+ gerado na membrana pelos sistemas primários (LOGAN et al., 1997).

As enzimas bombeadoras de prótons ATPase vacuolar (V-ATPase) e Pirofosfatase vacuolar (V-PPase) desempenham um papel fundamental no transporte de compostos nocivos no interior do vacúolo, regulando a pressão de turgescência e o pH citosólico, bem como mantendo a homeostase de íons e o estoque de metabólitos primários e

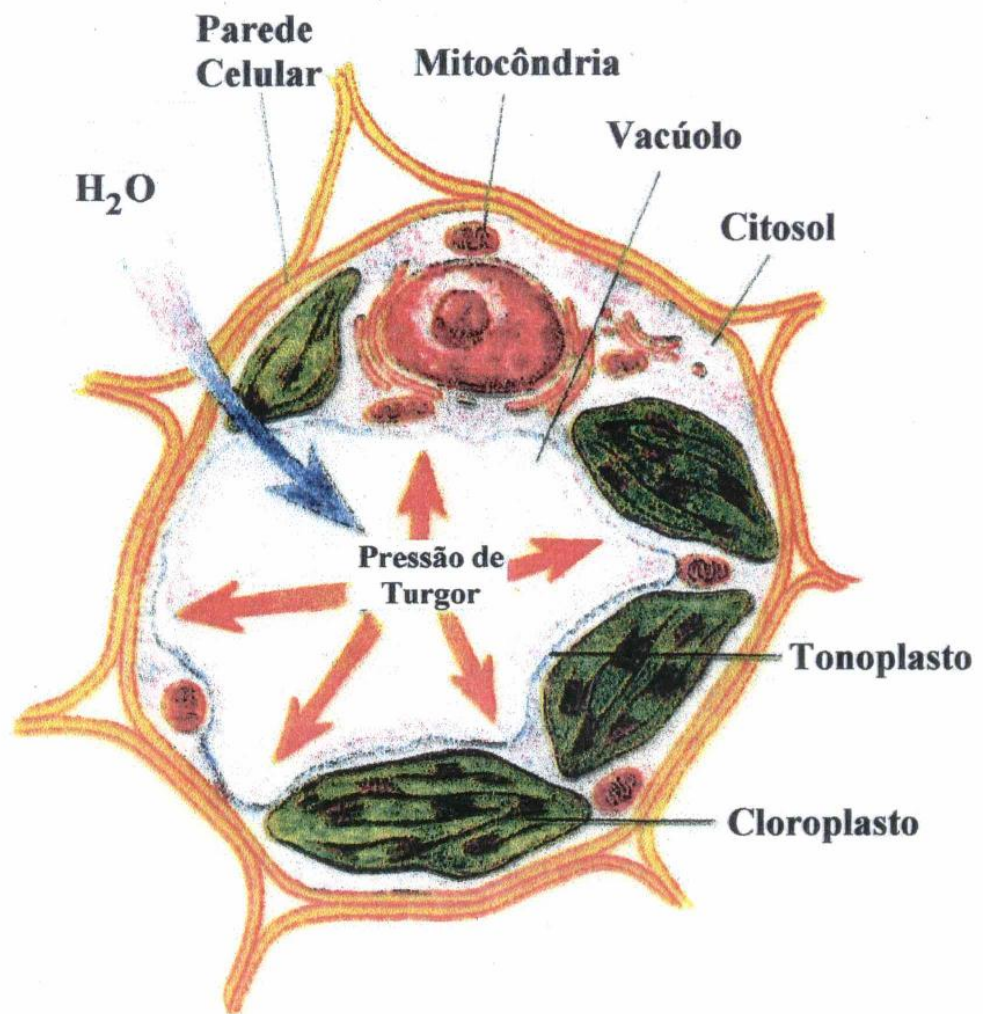


FIGURA 1- Célula vegetal (LENINGHER; NELSON; COX, 2000).

secundários (KABALA; KLOBUS, 2008). Elas utilizam a energia proveniente da quebra de ligações de alta energia das moléculas de ATP e PPi, respectivamente, para transportar H^+ para o interior do vacúolo. Dessa forma, um gradiente de prótons ($\Delta\mu H^+$) é gerado, o qual tem como componentes a variação de pH (ΔpH) e a variação do potencial de membrana ($\Delta\Psi$). A entrada de prótons realizada por essas bombas gera um potencial elétrico de membrana positivo do lado interno em relação ao lado externo do tonoplasto, bem como uma variação de pH, onde a concentração de H^+ é maior no interior do vacúolo em relação ao meio citoplasmático. O gradiente gerado pelas bombas de prótons fornece energia para os transportadores secundários (MAESHIMA, 2001).

A capacidade do transporte de sódio do citoplasma para o vacúolo via antiporte Na^+/H^+ é dependente da atividade da V-ATPase e da V-PPase (WANG; LÜTGE; RATAJKZAK, 2001). Os contratransportadores, presentes nas membranas vacuolar e plasmática, agem removendo íons Na^+ do citoplasma e transportando-os para o interior do vacúolo ou para fora da célula e dessa forma, previnem a toxicidade celular decorrente da acumulação excessiva de Na^+ (BLUMWALD; AHARON; APSE, 2000). Entre os vários transportadores e canais encontrados em membranas vacuolares de células vegetais, as bombas de prótons têm sido particularmente bem caracterizadas a nível molecular (MAESHIMA et al., 1996).

2.3.1 Caracterização da V-ATPase

A V-ATPase (Figura 2) é o maior complexo no tonoplasto, com um tamanho molecular total de aproximadamente 750 kD. O complexo da V-ATPase é composto de dois setores funcionais, um setor periférico (V_1) e um setor transmembranar (V_0) (MAESHIMA, 2001). O domínio V_1 é um complexo periférico composto de oito subunidades diferentes (A, B, C, D, E, G, H), responsável pela hidrólise do ATP e o domínio V_0 é um complexo integral de membrana que consiste de seis subunidades (a, c, c', c'', d, e), responsável pela translocação de prótons (GAXIOLA; PALMGREN; SCHUMACHER, 2007).

Três cópias das subunidades A alternam com três cópias das subunidades B para fazer parte do setor V_1 , que é conectado ao setor V_0 através de duas ou mais hastes, compostas das subunidades C, D, E, F, G, e H (KAWAMURA et al., 2001). A subunidade A de várias fontes de V-ATPase já foi clonada e seqüenciada e mostrou possuir uma variação em sua massa molecular de 67 a 73kDa. Ela é uma subunidade catalítica, com a função de catalisar a hidrólise do ATP (ZHAO et al., 2009). A subunidade B contém um local de ligação ao ATP

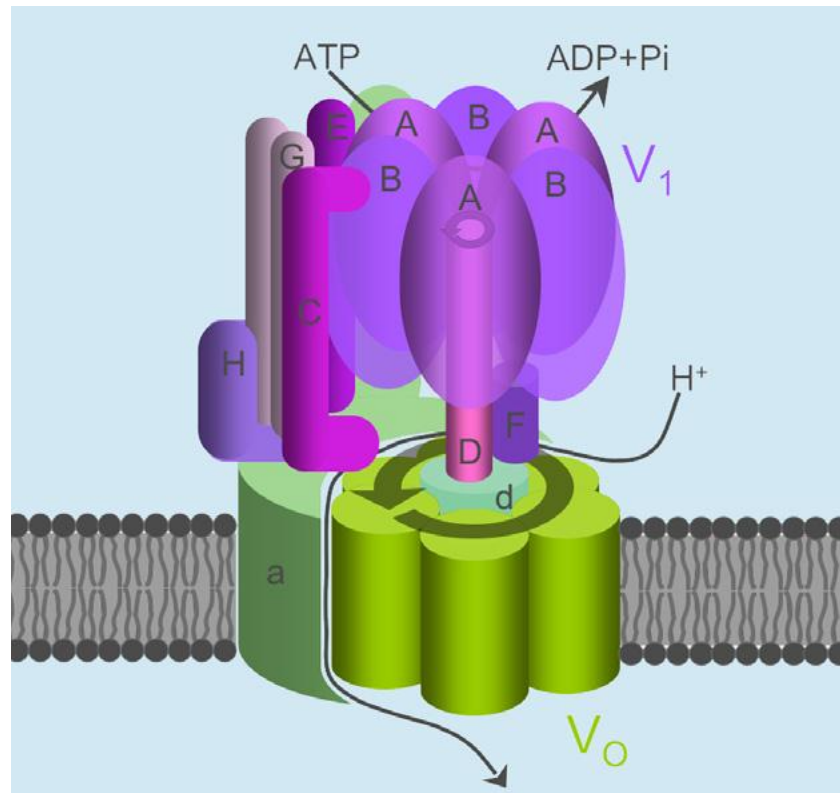


FIGURA 2- Modelo esquemático de V-ATPase de planta. O complexo periférico V_1 (roxo) e o complexo integral de membrana V_0 (verde) são unidos através de uma haste periférica formada pelas subunidades VHA-a, - C, - E, - G e H. A hidrólise do ATP realizada pelo hexâmero VHA-AB causa a rotação do eixo central que consiste das subunidades VHA-D e VHA-F, juntamente com o anel proteolipídico composto por cinco cópias de VHA-c e de uma cópia de VHA-c'. A rotação do anel c promove o transporte de H^+ através da membrana (GAXIOLA; PALMGREN; SCHUMACHER, 2007).

exercendo um papel na regulação. Tem sido demonstrado que as subunidades C, D e E interagem com as subunidades proteolípídicas (c ou c') e essas subunidades podem ter uma função potencial na transmissão da energia da hidrólise do ATP do domínio V_1 para o domínio V_0 . A subunidade E apresenta duas isoformas E_1 (37 kDa) e a E_2 (40 kDa) e está relacionada com a transmissão de energia da hidrólise do ATP do domínio V_1 para o domínio V_0 (KAWAMURA et al., 2001). A subunidade F apresenta massa aparente de 13 kDa, sendo encontrada em várias espécies de plantas e sua função não é conhecida. A subunidade G exerce um papel na prevenção da rotação da subunidade catalítica nas atividades da V-ATPase. A subunidade H é uma proteína hidrofílica de 54,4 kDa, sem homologia significativa com alguma outra proteína. Prévios estudos sugerem que a subunidade H inibe a atividade de dissociação do domínio V_1 da V-ATPase, desse modo prevenindo a não produção de hidrólise do ATP (BEYENBACH; WIECZOREK, 2006).

A subunidade a tem massa molecular de cerca de 90 kDa e é a maior subunidade da V-ATPase. A VHA-a tem uma estrutura quimérica com uma parte hidrofílica aminoterminal menos conservada e uma parte hidrofóbica C-terminal mais conservada. A parte C-terminal possui de 6 a 9 domínios transmembranares e contém resíduos de aminoácidos envolvidos na translocação vetorial de H^+ através da membrana (KLUGE et al., 2003). As subunidades c e c' possuem 16 kDa e cada uma contém quatro hélices transmembranares, com ambas N- e C-terminal presentes no lúmen da membrana. A subunidade c' possui 23 kDa e possui também quatro ou cinco hélices transmembranaras. Estudos prévios indicaram possíveis papéis da subunidade d na estabilização do conjunto V_0 e na associação de V_0 com V_1 de V-ATPases. A subunidade e é parte final do complexo da V-ATPase, tanto em leveduras como em outros eucariotos, e é essencial para o conjunto e a função da V-ATPase (BLAKE-PALMER et al., 2007).

A V-ATPase exibe duas atividades distintas: a atividade de hidrólise de ATP e a atividade de transporte de H^+ . Através de investigações em vacúolos e vesículas de tonoplasto isoladas de plantas CAM (plantas com metabolismo do ácido crassuláceo) por análises termodinâmicas, uma relação estequiométrica de 2 H^+ transportados / ATP hidrolisado foi sugerido para o acoplamento entre as atividades de transporte de H^+ e hidrólise de ATP (LÜTTEG et al., 1981; SMITH et al., 1984). Essas ATPases são estimuladas por ânions, como o cloreto, e, especificamente, inibidas por nitrato, bafilomicina A1 e concanamicina, e podem também ser inibidas pelo ADP, que compete com o ATP pelo sítio catalítico. Entretanto, são insensíveis ao inibidor da ATPase de membrana plasmática (ortovanadato) e ao inibidor da ATPase do tilacóide e da membrana mitocondrial (azida). Assim, a hidrólise de

ATP sensível ao nitrato e resistente à azida é usado para caracterizar a atividade das V-ATPases (RATAJCZAK, 2000).

Dentre as três bombas de prótons existentes em células de plantas, a H^+ -ATPase vacuolar (V-ATPase) é a enzima mais antiga e complexa. As V-ATPases possuem um ancestral comum com F-ATPases e A-ATPases de Archaeobactérias e são distribuídas por todos os reinos de vida (GAXIOLA; PALMGREN; SCHUMACHER, 2007). Acredita-se que a V-ATPase funciona como um modelo molecular análogo à F-ATPase. De acordo com esse modelo, todas as hastes periféricas e a cabeça formam o estator, enquanto um anel de seis ou mais subunidades c , juntamente com as subunidades que se projetam a partir do proteolípido para o centro da cabeça, representam o rotor. Uma mudança conformacional gerada pela hidrólise do ATP na subunidade A é convertida numa rotação da haste (subunidades D e F) que causa uma rotação no anel de subunidades c inserido na membrana. Os prótons são vetorialmente translocados do lado citoplasmático para o lúmen do vacúolo (KLUGE et al., 2003).

A V-ATPase usa a energia liberada durante a hidrólise do ATP para bombear prótons para o interior do lúmen vacuolar, criando, portanto, um gradiente de potencial eletroquímico e a força próton-motriz para uma variedade de eventos de transporte de íons e metabólitos. Assim, a V-ATPase é indispensável para o crescimento da planta em condições normais devido ao seu papel na dinamização do transporte secundário, na manutenção da homeostase do soluto e, eventualmente, na facilitação da fusão da vesícula (DIETZ et al., 2001).

A regulação fina e precisa da V-ATPase é extremamente importante para o desenvolvimento da planta e para a adaptação ao estresse (DIETZ et al., 2001). Um mecanismo de regulação da V-ATPase envolve a dissociação reversível do domínio V_1 do domínio V_0 e a subsequente parada da hidrólise do ATP e da obstrução da passagem de prótons. Esse mecanismo é provavelmente uma resposta à conservação de energia, já que a dissociação ocorre com a diminuição dos níveis de glicose. A dissociação glicose-dependente do complexo da ATPase ocorre rapidamente e não requer uma interação direta com a glicose (KANE, 2006).

Outro mecanismo de controle da atividade da V-ATPase envolve a formação de uma ligação reversível entre resíduos conservados de cisteína no sítio catalítico da V-ATPase (FENG; FORGAC, 1994). Quando uma ligação de dissulfeto é formada entre uma cisteína altamente conservada na seqüência da subunidade A catalítica (Cys254) e um segundo

resíduo altamente conservado de cisteína (Cys532) situado no lado do C-terminal da mesma subunidade, a atividade da V-ATPase é inibida reversivelmente (ABRAHAMS et al.,1994).

Um terceiro mecanismo da atividade de controle da V-ATPase envolve mudanças no acoplamento do transporte de prótons e da hidrólise de ATP. A enzima parece modificar-se para alterar a eficiência do acoplamento, baseada na observação de uma variedade de mudanças, como concentrações elevadas de ATP e mutações no número de subunidades (CIPRIANO et al., 2008).

Um mecanismo final de regulação da acidificação vacuolar *in vivo* envolve mudanças em outros transportadores, diferentes da V-ATPase. Como a V-ATPase é eletrogênica, ela estabelece um potencial positivo no lúmen da membrana durante o transporte, como consequência, pouco transporte de prótons pode ocorrer em compartimentos intracelulares a menos que acompanhado de um fluxo de compensação de carga. *In vivo* isso parece envolver primeiramente os canais intracelulares de cloreto, que permitem que o influxo de cloreto acompanhe o transporte ATP-conduzido do próton, assim dissipando o potencial positivo do lúmen da membrana (MULBERG et al.,1991).

2.3.2 Caracterização da V-PPase

A V-PPase (Figura 3) é um polipeptídeo simples, altamente hidrofóbico, consistindo de 14 a 17 domínios transmembranares α -hélices, com massa molecular de aproximadamente 80 kDa e sua função está relacionada à geração de um gradiente de prótons através de endomembranas usando a energia da ligação do fosfoanidrido das moléculas de pirofosfato inorgânico (PPi) (GAXIOLA; PALMGREN; SCHUMACHER, 2007). O substrato para as V-PPases, o PPi, é um subproduto de vários processos metabólicos, como a polimerização de DNA e RNA, a síntese de aminoacil-tRNA, a formação de ADP-glicose e UDP-glicose (MAESHIMA, 2000) e a conversão do piruvato em fosfoenolpiruvato (MARTINOIA; MAESHIMA; NEUHAUS 2007). A região catalítica da V-PPase contém um sítio ligante de Mg-PPi que é responsável pela hidrólise do PPi e adicionalmente existem cinco voltas citoplasmáticas que são responsáveis pela conversão da energia da hidrólise, três dos quais estão conservados em todas as PPases (GAXIOLA; PALMGREN; SCHUMACHER, 2007). Além disso, a V-PPase é o componente principal das membranas vacuolares capaz de gerar um $\Delta\mu\text{H}^+$ de magnitude igual ou superior ao da V-ATPase. A estimativa do teor das enzimas sugere que as mesmas constituem de 1% (*Beta vulgaris*) a 5-

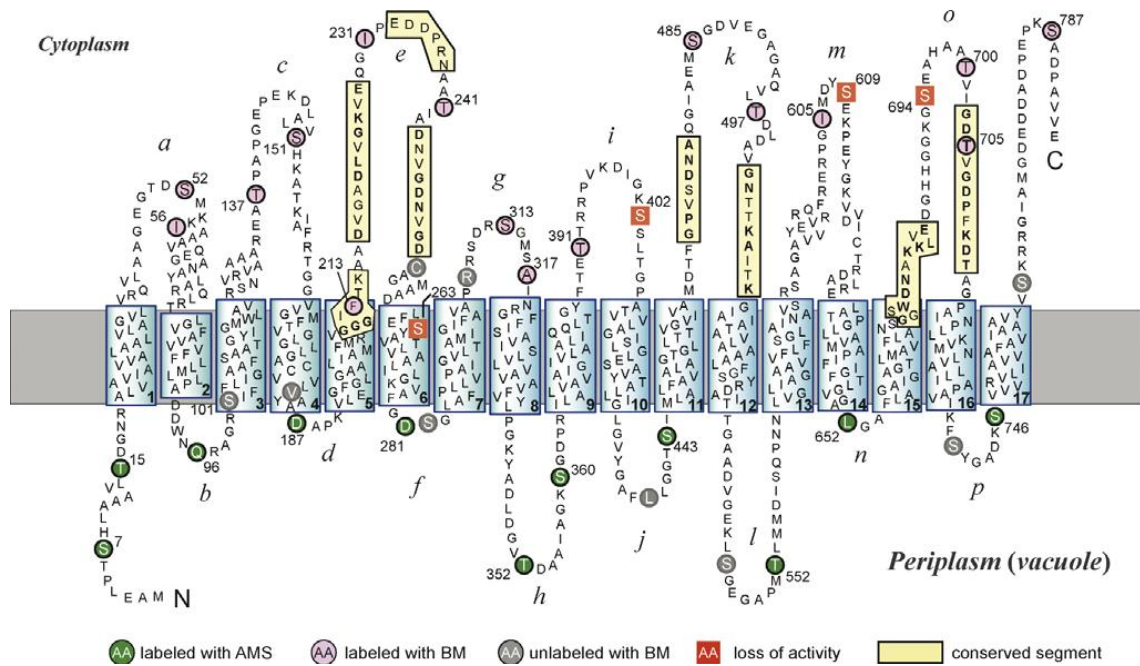


FIGURA 3- Modelo esquemático da V-PPase. Os domínios transmembranares (1-17) são agrupados e numerados. As regiões conservadas, tais como DVGADLVGKVE, são identificadas por meio de caixas amarelas. Os resíduos substituídos com cisteínas são marcados com círculos. Os resíduos que são acessíveis ao periplasma são indicados por círculos verdes e aqueles que não são acessíveis são indicados por círculos roxos. Os resíduos que estão em um local hidrofóbico são indicados pelas letras brancas dentro de círculos cinzas. Os resíduos que causam a inativação da enzima pela substituição com cisteína são indicados por quadrados vermelhos (GAXIOLA; PALMGREN; SCHUMACHER, 2007).

10% (*Vigna radiata*) da proteína total da membrana vacuolar (MAESHIMA; YOSHIDA, 1989). Geralmente, a atividade da V-PPase é maior em tecidos jovens, entretanto, em alguns casos, a V-PPase é também a bomba de próton predominante em células de plantas maduras (MARTINOIA; MAESHIMA; NEUHAUS 2007).

A V-PPase é encontrada em plantas, algas, bactérias fotossintéticas, protozoários e Archeobactérias, mas não é encontrada em fungos ou em mamíferos (MARTINOIA; MAESHIMA; NEUHAUS 2007).

As atividades, tanto de transporte de prótons dependente de PPi quanto a de hidrólise estimulada por K^+ e/ou insensível a molibdato, têm sido demonstradas em membranas vacuolares da maioria dos tipos principais de plantas vasculares (monocotiledôneas, dicotiledôneas, C3, C4 e CAM) como também em seus prováveis ancestrais, as algas clorófitas (MAESHIMA; YOSHIDA, 1989). As plantas possuem dois tipos filogeneticamente distintos de V-PPase: a do tipo I, que é dependente de K^+ citosólico para a sua atividade e é moderadamente sensível à inibição por Ca^{2+} , e a do tipo II, que são insensíveis ao potássio, mas extremamente sensíveis ao Ca^{2+} . Uma função importante das V-PPases no crescimento e no desenvolvimento das plantas foi apresentada pelo estudo do desenvolvimento da pêra, mostrando que os níveis de proteína e de atividade do tipo I da V-PPase aumentaram no fruto jovem e em células em divisão. Também foi mostrado que a superexpressão da PPase tipo I (AVP1) em *Arabidopsis* resultou no aumento da divisão celular no começo da formação dos órgãos e aumentou o transporte de auxina (GAXIOLA; PALMGREN; SCHUMACHER, 2007). Li et al. (2005) relataram que, em *Arabidopsis*, além de manter o pH vacuolar, a H^+ -pirofosfatase, AVP1, controla o transporte de auxina e, consequentemente, o desenvolvimento auxina-dependente.

O teor da V-PPase varia de acordo com as condições fisiológicas e em resposta a estresses ambientais (MAESHIMA, 2000). Colombo; Cerrana (1993) relataram um aumento da atividade da V-PPase em suspensão de células de cenoura em condição de estresse salino (NaCl). Foi demonstrada a importância da V-PPase em células de plantas sob o efeito do estresse causado pela anoxia e pelo frio (CARYSTINOS et al., 1995; REA; POOLE, 1993). Eles propuseram que a V-PPase pode substituir a V-ATPase sob condição de estresse energético para manter o vacúolo acidificado. Nessas condições ambientais severas, as plantas que são sensíveis a baixas temperaturas sofrem sérias injúrias pelo frio (YOSHIDA et al., 1979). A PPase vacuolar de plantas é uma das raras enzimas encontradas em vegetais que pode fornecer informações úteis no âmbito da Biologia Molecular e da Bioenergética (MAESHIMA, 2000).

2.4 Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são produzidas nas células tanto sob condição de estresse como sob condição não-estressante. As plantas possuem sistemas de defesa bem desenvolvidos para combater as EROS, envolvendo a limitação da sua formação e a sua remoção. Sob condições não-estressantes, a formação e a remoção das EROS estão em equilíbrio. O estresse oxidativo é caracterizado pela superprodução de espécies de oxigênio altamente reativas e pode ser induzido por uma ampla variedade de fatores ambientais, tais como estresse salino, estresse osmótico, invasão de patógenos, ação de herbicidas, dentre outros. Os estresses abióticos agem como catalisadores nas reações de produção de radicais livres: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (OH^{\cdot}) e moléculas, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio *singlet* (1O_2), ozônio (O_3) e radicais alcoxi (RO) (HERNANDEZ et al., 2000).

Para proteção das organelas e das membranas celulares dos efeitos danosos de concentrações tóxicas de EROS, as plantas desenvolveram um complexo mecanismo de defesa (FOYER; DESCOURVIERES; KUNERT, 1994; MEHDY et al., 1996), incluindo um sistema enzimático, que compreende a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase, catalase, glutathione redutase e tioredoxina redutase, e um sistema não-enzimático composto por moléculas antioxidantes, como ácido ascórbico, glutathione, carotenóides, a-tocoferol (MITTLER, 2002) e compostos fenólicos (SAKIHAMA et al., 2002). Tem sido proposto que a proteção contra os efeitos negativos decorrentes da produção de EROS, na célula vegetal, depende da atividade coordenada entre os sistemas não enzimáticos e a atividade do sistema enzimático (SCANDALIOS, 1993). Apesar disso, quando a geração de EROS ultrapassa as defesas celulares desenvolvidas, então o estresse oxidativo é observado (MEHDY et al., 1996).

A inter-relação entre água e estresse induzido por acumulação de ácido abscísico (ABA), a geração de EROS e as atividades de várias enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e glutathione redutase (GR) foi investigada em folhas de plantas de milho individuais (*Zea mays* L.) submetidas a estresse hídrico $\pm 0,7$ MPa induzido por polietileno glicol (PEG 6000) por Jiang; Zhang (2002). Eles observaram que o estresse hídrico induzido pelo o acúmulo de ABA desencadeia um aumento crescente na geração de EROS, que, por sua vez, leva ao aumento da regulação do sistema de defesa antioxidante.

Dentro das células, as superóxidos dismutases (SOD; E.C 1.15.1.1) constituem a primeira linha de defesa contra as EROS (ALSHER; ERTURK; HEATH., 2002) e possuem três isoformas: a Cu/Zn-SOD que, em geral, é inativada por KCN e H₂O₂, ocorrendo geralmente no citoplasma e no cloroplasto; a Fe-SOD, inativada por H₂O₂, e resistente a KCN, ocorrendo no cloroplasto; e a Mn-SOD, resistente a H₂O₂ e KCN, e presente nas mitocôndrias (BOWLER; MONTAGU; INZÉ, 1992; DEL RIO et al., 1998). O ²⁻O é produzido em todo local onde há uma cadeia transportadora de elétrons. Assim, a ativação do O₂ pode ocorrer em diferentes compartimentos celulares, como mitocôndrias, cloroplastos, glioxissomos, peroxissomos, apoplasto e citosol (ALSHER; ERTURK; HEATH, 2002). O radical superóxido (O²⁻) tem uma meia vida de menos de um segundo e é geralmente rapidamente dismutado pela enzima SOD à H₂O₂, um produto que é relativamente estável e pode ser detoxificado pelas enzimas catalase (CAT) e peroxidases (GRANT; LOAKE, 2000). Essa reação tem uma taxa 10 000 vezes maior que a dismutação espontânea. O aumento na atividade da SOD parece conferir tolerância ao estresse oxidativo (BOWLER; MONTAGU; INZÉ, 1992).

A enzima catalase (CAT; E.C 1.11.1.6) é uma das mais importantes enzimas antioxidantes. Ela é tetramérica e está presente nos organismos aeróbicos, protegendo-os contra os efeitos tóxicos do H₂O₂ (SCANDALIOS, 1992). É encontrada no citoplasma, na mitocôndria e nos peroxissomos de células animais, vegetais e de microrganismos, atuando como reguladores dos níveis de H₂O₂, os quais são decompostos em H₂O e O₂ (GUAN; SCANDALIOS, 2000; WILLIAMSON; SCANDALIOS, 1992). A enzima, como um todo, apresenta quatro subunidades idênticas, cada uma com massa molecular de aproximadamente 56-60 kD (GUAN; SCANDALIOS, 1993). A atividade catalítica desta enzima pode ser inibida por superóxido, azida e cianeto de hidrogênio. No entanto, o inibidor mais usado é o aminotriazol. Com relação ao pH, pode-se observar uma diminuição da atividade da enzima em pH menor que 4,0. Na faixa de pH 4,0 a 8,5, a atividade da catalase permanece constante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Além da catalase, os seres vivos possuem vias adicionais de remoção de H₂O₂, as peroxidases. Elas reduzem peróxidos celulares a partir de substratos redutores. As plantas possuem dois tipos de heme-peroxidases: as não-específicas, secretadas no espaço extracelular e as ascorbato peroxidases (FOYER; NOCTOR, 2000). A enzima ascorbato peroxidase (APX; E.C 1.11.1.11) utiliza o ascorbato (AsA) como seu doador específico de elétrons para reduzir H₂O₂ à água com a concomitante geração de monodehidroascorbato (MDAsA), um oxidante univalente de AsA. Estudos envolvendo purificação, clonagem

molecular e funções fisiológicas de isoenzimas da APX indicam que essas são enzimas chaves na prevenção contra o estresse oxidativo em organismos fotossintéticos (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003), podendo ser inibida por cianeto e azida (FOYER; NOCTOR, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o efeito do ácido abscísico nos parâmetros de crescimento e fisiológicos, bem como o efeito na atividade hidrolítica e na expressão de transcritos das bombas de prótons vacuolares e na atividade de enzimas antioxidantes de plantas de *Vigna unguiculata*.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar os parâmetros de crescimento (peso fresco, peso seco, comprimento e área foliar) em folhas, caules e raízes de plantas de *Vigna unguiculata* - cultivar pitiúba - com 15 dias de germinação na ausência e na presença de ácido abscísico (ABA);
- Analisar os parâmetros fisiológicos (condutância estomática, transpiração, fotossíntese e concentração interna de CO₂) em folhas de plantas de *Vigna unguiculata* - cultivar pitiúba - com 15 dias de germinação na ausência e na presença de ácido abscísico (ABA);
- Avaliar a atividade de hidrólise da V- PPase e da V- ATPase em folhas e raízes de plantas de *Vigna unguiculata* - cultivar pitiúba - com 15 dias de germinação na ausência e na presença de ácido abscísico (ABA);
- Avaliar os níveis de transcritos da V-PPase e da subunidade A da V- ATPase em folhas e raízes de plantas de *Vigna unguiculata* - cultivar pitiúba - com 15 dias de germinação na ausência e na presença de ácido abscísico (ABA);
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes [superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX)] em folhas e raízes de plantas de *Vigna unguiculata* - cultivar pitiúba - com 15 dias de germinação na ausência e na presença de ácido abscísico (ABA).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Foram utilizadas sementes de *Vigna unguiculata* L. Walp cv. pitiúba oriundas de plantação minifundiária localizada no município de Beberibe-CE e posteriormente encaminhadas ao Laboratório de Bioenergética da Universidade Federal do Ceará, onde foram distribuídas em frascos e armazenadas a 4° C.

4.2 Metodologia

4.2.1 Condições de crescimento

As sementes selecionadas de *Vigna unguiculata* cv. pitiúba foram esterilizadas com hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5% (v/v) durante 5 minutos para eliminação de possíveis patógenos presentes em seu tegumento e então lavadas em água corrente e depois lavadas 3 vezes com água destilada. Em seguida, as sementes foram germinadas em bacias contendo areia de rio devidamente lavada e autoclavada. As plantas cresceram por um período de 15 dias, com aplicação diária de água, mantendo-se o solo na capacidade de campo e adicionando-se frações de lixiviação para prevenir o acúmulo excessivo de sais. A aplicação da água foi feita de forma localizada, de modo a evitar o contato direto da mesma com as folhas. Porém, no terceiro, no sétimo e no décimo dias após a germinação, as plantas receberam aplicações de solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1938) na ausência (controle) e na presença de ácido abscísico (ABA) 0,1 µM. Após o período de desenvolvimento (15 dias), os diferentes tecidos das plantas (folha, caule e raiz) foram coletados para realização de análises posteriores. O meio nutritivo de Hoagland é formado por:

KNO ₃ 1M	3 mL/L
NH ₄ H ₂ PO ₄ 1M	0,5 mL/L
MgSO ₄ 1M	1 mL/L

Ca(NO ₃) ₂ 1M	2 mL/L
Fe-EDTA 0,5%	2,5 mL/L
Microelementos [H ₃ BO ₃ ; MnCl ₂ ; ZnSO ₄ ; CuSO ₄ ; (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇]	0,5 mL/L

4.2.2 Parâmetros de crescimento

As diferentes partes das plantas (folha, caule e raiz) de cada condição (controle e ABA 0,1 µM) foram coletadas 15 dias após a germinação para a realização das medidas de comprimento e das análises de peso fresco. A área foliar foi medida utilizando-se de um medidor de superfície (LI – 3100, Area Meter, Li-Cor., Inc., Lincoln, Nebraska, USA). As partes das plantas de cada condição, após pesadas e medidas, foram colocadas para secar em estufa com circulação forçada de ar, a 60°C por cinco dias, para obtenção da matéria seca total.

4.2.3 Parâmetros fisiológicos

Ao final de 15 dias de crescimento, foram efetuadas medições de condutância estomática (gs), transpiração (E), taxa fotossintética líquida (A) e concentração interna de CO₂ (Ci) em uma das folhas não-cotiledonares totalmente expandidas de todas as plantas de cada tratamento por meio de um analisador de gás infravermelho portátil (IRGA, ADC System - Hoddesdon, UK), sendo as leituras realizadas entre 8:00 e 10:00 horas da manhã, considerando-se umidade relativa do ar, temperatura e radiação do ambiente.

4.2.4 Extração de proteínas solúveis

As folhas e as raízes das plantas de cada condição (controle e ABA 0,1 µM) foram macerados em 5 mL de meio de homogeneização [manitol 600mM, MgSO₄ 3mM, EDTA 5mM, EGTA 3mM, PVP 40 0.5% (m/v), Tris 100 mM pH 8,0, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Benzamidina 1 mM], utilizando-se pistilo e gral imerso em gelo. Após a maceração, o extrato foi centrifugado a 5 000 g, a 4 °C por 5 minutos em microcentrífuga NOVATÉCNICA NT 805. O sobrenadante foi coletado, centrifugado a 10 000 g, a 4 °C por 30 minutos e o

precipitado foi ressuspenso em meio de homogeneização. Em seguida, ele foi armazenado em nitrogênio líquido para ser utilizado em análises posteriores.

4.2.5 Determinação de proteínas

As proteínas contidas no extrato obtido de folhas e de raízes para cada condição (controle e ABA 0,1 μM) foram determinadas utilizando-se o método de Lowry; Rosebrough; Farr (1951). A dosagem consistiu na adição, com posterior agitação, de 5 μL da amostra extraída em 195 μL de água destilada e 1 mL da solução C, formada pela união da solução A com a solução B na proporção de 50:1 (v/v). Esperados 10 minutos, foi adicionado 100 μL de Folin 1 N, agitando-se os tubos de ensaio. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm após 30 minutos. A concentração de proteínas foi determinada através de uma curva padrão previamente construída para a albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações entre 0 e 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e a análise foi realizada em duplicata.

Solução C = Solução A + Solução B

Solução A:

Carbonato de Sódio	2 g
NaOH 0,1 N	100 mL

Solução B:

Citrato de Sódio	1,0 g
Sulfato de Cobre	0,5 g
H ₂ O bidestilada q.s.p.	100 mL

4.2.6 Atividade de hidrólise da V-ATPase e da V-PPase

As atividades de hidrólise de ATP ou PPi realizadas pelas enzimas V-ATPase sensível ao Nitrato (ΔNO_3^- ATPase) e V-PPase estimulada por K^+ (ΔK^+ PPase), respectivamente, foram determinadas pelo método colorimétrico de Fiske; Subbarow (1925). Primeiramente, em tubos de ensaio em duplicata para cada condição (controle e ABA 0,1 μM), foram adicionados ATP-BTP 100 mM pH 7,0 ou PPi-BTP 100 mM pH 7,0 ao meio

(0,5mL) contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,0, MgSO₄ 100 mM, Na₃VO₄ 10 mM (inibidor de ATPase de membrana plasmática), Azida 100 mM (inibidor de ATPase mitocondrial), NaMoO₄ 10 mM (inibidor de fosfatases), KCl 2 M e, por último, 60 µg/µL de proteína. Em seguida, os tubos já homogeneizados foram submetidos a banho-maria a 37 °C por 30 minutos para efetuar-se a reação enzima-substrato. Após esse tempo, a reação foi parada pela adição de 1 mL do reagente de Fiske, preparado minutos antes de sua utilização devido sua instabilidade. Decorridos 10 minutos, necessários para o desenvolvimento da coloração, as leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro em 750 nm. A atividade de hidrólise da Δ NO₃-ATPase foi determinada na ausência e presença de KNO₃ 100 mM (O'NEILL; BENNET; SPANSWICK, 1983). A atividade de hidrólise da Δ K⁺-PPase foi calculada pela diferença entre as atividades medidas em presença e ausência de KCl 2 mM (WANG; LEIGH; KAESTNER, 1986). A atividade da PPase foi calculada como metade da taxa de Pi liberado a partir da hidrólise do PPi (µmoles de PPi consumido por unidade de tempo). A concentração de Pi foi determinada em relação a uma curva padrão KH₂PO₄.

O reagente de Fiske é formado pela união da solução A com a solução B na proporção de 100:1 (v/v).

Solução A:

H ₂ O	900 mL
H ₂ SO ₄	20,4mL
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	5,2 g
SDS	5 g
H ₂ O q.s.p.	1 L

Solução B:

Ácido Ascórbico 10% (m/v)

Para uma concentração de 0,3 µmoles de Pi foi utilizada a absorbância para o cálculo da atividade específica conforme a equação descrita abaixo:

$$\text{Atividade específica} = \frac{\text{Abs. do meio reacional} \times 0,3 \text{ } \mu\text{moles de Pi}}{\text{Abs. de } 0,3 \text{ } \mu\text{moles de Pi} / 30\text{min} / 0,06 \text{ mg de proteína}}$$

4.2.7 Isolamento de RNA total

O isolamento do RNA foi realizado através do uso de um “kit” de extração – *RNeasy Plant Mini kit* (Qiagen, Hilden, Germany). Aproximadamente 200 mg de folhas e de raízes de plantas de *Vigna unguiculata* cv. pitiúba, nas condições controle e na presença de ácido abscísico (ABA 0,1 μ M), previamente congelados em N₂ líquido e armazenados a -80 °C foram macerados em gral pré-resfriado contendo nitrogênio líquido. Os lisados celulares pulverizados foram então transferidos para tubos eppendorf, onde foram adicionados 450 μ L de um tampão contendo isotiocianato de guanidina, que inativa RNAases e então realizada uma homogeneização em “vortex”. A amostra foi aplicada em uma mini coluna do “kit” (“QIAshedder spin column”- lilás, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e centrifugada a 8000g por 2 min em centrífuga Sorvall Biofuge *pico*, rotor F-4518-11 (Eppendorf, Alemanha). O eluído foi transferido para outro tubo eppendorf juntamente com 450 μ L de etanol 95%, que fornece condições adequadas de ligação do RNA. Posteriormente, 700 μ L dessa mistura foram transferidos para uma nova coluna do “kit” (“RNeasy mini spin column” – rosa, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e efetuada uma centrifugação a 8000 g por 15 seg para lavagem. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor juntamente com 500 μ L de RPE e submetida à centrifugação de 8000 g por 15 seg. O eluído foi descartado e o tubo coletor reutilizado na mesma coluna. 500 μ L de RPE foram adicionados à coluna e esta centrifugada a 8000 g por 2 min para remoção de resíduos de etanol. O eluído e o tubo coletor foram descartados e a coluna reutilizada com um novo tubo coletor de 1,5 mL. Finalmente, foram adicionados 40 μ L de água livre de RNAase diretamente à coluna e esta centrifugada a 8000 g por 1 min para completa eluição. O eluído é o RNA total. Este foi armazenado a -80 °C para análises posteriores.

A concentração do RNA foi avaliada por espectrofotometria retirando-se 2 μ L do RNA extraído, colocando-se em outro eppendorf juntamente com 198 μ L de água DEPC (fator de diluição = 100) para realizar-se a leitura em espectrofotômetro PHARMACIA BIOTECH, modelo ULTROSPEC 2000 nas seguintes absorvâncias: 230 nm, 260 nm, 280 nm e 320 nm. Para observação do grau de pureza do RNA usou-se a relação ($D.O_{260\text{ nm}}/D.O_{280\text{ nm}}$) e para o cálculo da concentração de RNA utilizou-se a seguinte fórmula:

$$[\text{RNA}] = 40 \mu\text{g/mL} \cdot \text{FD} \cdot \text{DO}_{260\text{nm}}$$

Onde:

[RNA] → concentração de RNA da amostra

40 µg/mL → concentração de 1 D.O. em 260 nm para RNA

FD → Fator de diluição usado para fazer a leitura;

DO_{260nm} → Densidade óptica obtida no comprimento de onda de 260 nm.

Para avaliar a integridade do RNA extraído e para observar as bandas correspondentes às subunidades ribossomais, foi realizada eletroforese com aplicação do equivalente a 0,5 µg da amostra de RNA em gel de agarose a 1,5% com tampão MOPS 1 X, utilizando-se cuba eletroforética da marca PHARMACIA modelo GNA 100 (7.5x10cm) acoplado à fonte regulável de corrente contínua BIO RAD (Power - pac 300) com amperagem constante de 50 mA por aproximadamente 30 minutos à temperatura de 25⁰ C. O gel foi tratado com brometo de etídio (0,5µg/mL) por aproximadamente 10 minutos e as bandas foram detectadas pela emissão de fluorescência obtida pela exposição do gel a raios ultravioleta de um fotodocumentador DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro com auxílio do software GelCapture™.

4.2.7.1 RT-PCR

A síntese de cDNA (Transcrição reversa – RT) e a posterior reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas a partir de 2 µg de RNA total extraído de folhas e de raízes de plantas de *Vigna unguiculata* cv. pitiúba, nas condições controle e presença de ácido abscísico (ABA 0,1 µM), com auxílio de um “kit” ImpromII™ Transcriptase Reverse (Promega, Estados Unidos).

Primeiramente, fragmentos de cDNA foram obtidos através da reação da Transcriptase Reversa a partir do RNA total e do oligo dT₁₈ como iniciador. Para tanto, foi adicionado a tubos eppendorfs o seguinte meio de reação para RT:

H₂O milli-Q autoclavada q.s.p. 19 µL

RNA 2 µg

Oligo dT₁₈ 20 pmol/µL 3 µL

dNTP's 10 mM 1 µL

Tampão 5x	4 µL
MgCl ₂ 25 mM	2,4 µL
Transcriptase reversa	1 µL

Inicialmente, os tubos contendo apenas H₂O milli-Q autoclavada e RNA foram colocados em banho-maria a 65 °C durante 5 min e, logo em seguida, colocados em contato com gelo por aproximadamente 2 min. Então, foi adicionado o restante dos reagentes (inclusive a Transcriptase Reversa) e os tubos colocados em termociclador THECHNE TC-512 a 37 °C por 1 hora para ocorrer a reação da transcrição reversa. Após esse tempo, os tubos foram colocados a 75 °C por 10 minutos para a desnaturação da transcriptase reversa e em seguida armazenados a 4 °C. Posteriormente, o produto de RT foi amplificado por PCR utilizando-se *primers* específicos desenhados para a V-PPase (*VuHVP*), para a subunidade A da V-ATPase (*VuVHA-A*) e para a actina (*Actina*), que funciona como gene constitutivo (COSTA et al., 2004), de *Vigna unguiculata*. As sequências de cDNA estão disponíveis no GenBank [(cDNA da PPase– **DQ056749**, cDNA da subunidade A da ATPase – **DQ056751**)]. As sequências dos *primers* foram: *VuVHP* senso: 5' ACTGGTTATGGTCTCGGTGGGT 3' e antisenso: 5' CCAGGGCATCAGTTCTCTCACG 3'; *VuVHA-A* senso: 5' GCCTCCTGATGCCATGGGA 3' e antisenso: 5' CGCATCATCCAAACAGACT 3'; *Actin* senso: 5' GCGTGATCTCACTGATGCC 3' e antisenso: 5' TCGCAATCCACATCTGTTGG 3'. O seguinte meio de reação para PCR foi utilizado (COSTA et al., 2010):

H ₂ O Milli-Q autoclavada	q.s.p. 25 µL (15,9 µL)
Produto de RT	1 µL
dNTP's 5 mM	1 µL
Tampão 5x	5 µL
<i>Primer F</i>	1 µL
<i>Primer R</i>	1 µL
Taq polimerase	0,1 µL

Os tubos contendo o meio de reação foram colocados em termociclador THECHNE TC-512 para a amplificação dos genes *VuHVP* e *VuVHA-A* de folhas e de raízes de plantas na ausência (controle) e presença de ABA 0,1 μM . O programa de PCR utilizado para *VuHVP* (28 ciclos) e *VuVHA-A* (28 ciclos) foi:

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (min)
Desnaturação	93	3
Anelamento	55 (<i>VuHVP</i>) e 62,5 (<i>VuVHA-A</i>)	1
Alongamento	72	1 (<i>VuHVP</i>) e 1,5 (<i>VuVHA-A</i>)
Extensão	72	5
Armazenamento	4	α

4.2.7.2 Eletroforese do cDNA amplificado

A avaliação da amplificação do cDNA da V-PPase e da subunidade A da V-ATPase, assim como da actina, de folhas e de raízes de *Vigna unguiculata* na ausência (controle) e na presença de ABA 0,1 μM foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando-se TBE 1X (Tris-Borato 90 mM, EDTA 2 mM) como tampão de corrida em cuba eletroforética da marca PHARMACIA modelo GNA 100 (7.5x10cm). Após a aplicação da amostra no gel (5 μL) para visualização das bandas, foi aplicada uma corrente contínua de 40 mA durante 45 min a 25 $^{\circ}\text{C}$ por uma fonte regulável BIO RAD (Power - pac 300). O gel foi tratado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 10 minutos e as bandas foram detectadas pela emissão de fluorescência obtida pela exposição do gel a raios ultravioleta de um fotodocumentador DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro com auxílio do software GelCaptureTM. Para comparar o nível de expressão do RNAm das bombas de prótons contra o nível do RNAm da actina, uma análise das imagens foi realizada. A densidade das bandas foi analisada com o programa Scion Image, Release beta 3b (Scion Corporation, USA).

4.2.8 Atividade de enzimas antioxidantes

4.2.8.1 Preparação do extrato

As folhas e as raízes de *Vigna unguiculata* na ausência (controle) e na presença de ABA 0,1 μM foram congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, liofilizadas. Depois esse material foi macerado até se transformar em pó e armazenado a 4 °C. Uma quantidade de 0,1 g do material vegetal foi então homogeneizada em 10 mL de tampão de extração (Tampão Fosfato de Potássio 50 mM pH 8,0; EDTA 0,1 mM) e centrifugada a 10 000 g por 15 min em centrífuga NOVATÉCNICA NT 815. O sobrenadante foi utilizado como extrato.

4.2.8.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD) (E.C 1.15.1.1)

O ensaio da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizado em tubos contendo 1 mL de tampão Fosfato de Potássio 36 mM pH 7,8; EDTA 0,1 mM e Metionina 19,5 mM. Aos tubos foram acrescentados 50 μL do extrato enzimático, 150 μL de NBT 750 μM e 300 μL de riboflavina 10 μM . A seguir, os mesmos foram transferidos para câmara escura acoplada com lâmpada fluorescente de 20 W. A lâmpada foi ligada concomitantemente com o disparo do cronômetro e, após 15 minutos, a atividade da SOD foi medida através de leitura espectrofotométrica a 560 nm em espectrofotômetro BIOCHROM LIBRA S12. A atividade é expressa em unidades de atividade $\times \text{g}^{-1}$ de matéria seca. Considera-se 1 unidade de atividade enzimática a quantidade de enzima requerida para causar uma inibição de 50% na taxa de redução do NBT.

4.2.8.3 Atividade da catalase (CAT) (E.C 1.11.1.6)

Os ensaios da atividade da catalase (CAT) foram realizados utilizando-se o tampão Fosfato de Potássio 50 mM pH 7,0 e concentração final de H_2O_2 de 15 mM. A reação foi iniciada com adição de 15 μL do extrato enzimático e as leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro BIOCHROM LIBRA S12, monitorando a decomposição de H_2O_2 a 240 nm ($\epsilon = 36 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$) durante 5 min (de 15 em 15 segundos), após o início da reação. O branco foi composto de meio de reação livre de H_2O_2 . A atividade da CAT foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

4.2.8.4 Atividade da ascorbato peroxidase (APX) (E.C 1.11.1.11)

A determinação da atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi feita através de meio contendo 1,1 mL de tampão Fosfato de Potássio 50 mM pH 6,0 com EDTA 50 mM; 50

μL de H_2O_2 30 mM; 50 μL de ácido ascórbico 0,5 mM e 300 μL de extrato enzimático. A atividade foi medida espectrofotometricamente em espectrofotômetro BIOCHROM LIBRA S12 a 290 nm ($\epsilon = 2,8 \text{ mM cm}^{-1}$) em intervalos de 15 em 15 segundos durante 5 minutos. A atividade enzimática da APX é expressa em $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{min/g}$ de matéria seca.

4.2.9 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey com $\alpha = 0,05$, utilizando-se o pacote estatístico ASSISTAT (SILVA, 1996).

5 RESULTADOS

5.1 Análise dos parâmetros de crescimento

As diferentes partes das plantas de *V. unguiculata* (folha, caule e raiz) de cada condição (controle e ABA 0,1 μ M) foram coletadas 15 dias após a germinação para a análise dos parâmetros de crescimento (Figura 4).

O ácido abscísico (ABA) estimulou significativamente o crescimento de plantas de feijão-caupi em relação ao controle (Figura 5). O aumento na massa fresca e seca das folhas foi 22,33% e 34,28%, respectivamente, e da parte aérea foi de 19,69% e 35,61%, respectivamente (Figuras 5a e 5b). A área foliar e o comprimento da raiz aumentaram 36,70% e 38,09%, respectivamente (Figuras 5c e 5d). No entanto, nas raízes, a massa fresca não apresentou alteração significativa e o peso seco diminuiu significativamente cerca de 37,37% em relação ao controle.

5.2 Análise dos parâmetros fisiológicos

A condutância estomática (gs), a transpiração (E), a taxa fotossintética (A) e a concentração interna de CO₂ (Ci) em folhas de plantas de feijão-caupi com 15 dias de germinação submetidas a aplicações de ácido abscísico foram avaliadas, contudo, esses parâmetros não foram significativamente alterados pelo tratamento com ABA 0,1 μ M em relação ao controle (Figura 6).

5.3 Avaliação da atividade hidrolítica da V-ATPase e da V-PPase

As atividades hidrolíticas da V-ATPase e da V-PPase em folhas e em raízes de plantas de *Vigna unguiculata* cv. Pitiúba com 15 dias de germinação, na condição controle e tratada com ABA 0,1 μ M, são mostradas na figura 7.

A atividade hidrolítica da V-ATPase (Figura 7a) foi significativamente maior nas folhas das plantas tratadas com 0,1 μ M de ABA (693,47%) em relação às plantas controle. No entanto, para a V-PPase (Figura 7b), o aumento da atividade hidrolítica induzida por ABA foi observada apenas nas raízes e apresentou valor de 2 082,07% em relação ao controle.



FIGURA 4 - Crescimento de plantas de *Vigna unguiculata* cv. Pitiúba. As sementes foram germinadas como descrito em Material e Métodos. Após 15 dias, as plantas germinadas em ausência de ABA (controle) e em presença de ABA ($0,1 \mu\text{M}$) foram coletadas para determinação de todas as análises realizadas. O tamanho das plantas foi expresso em cm.

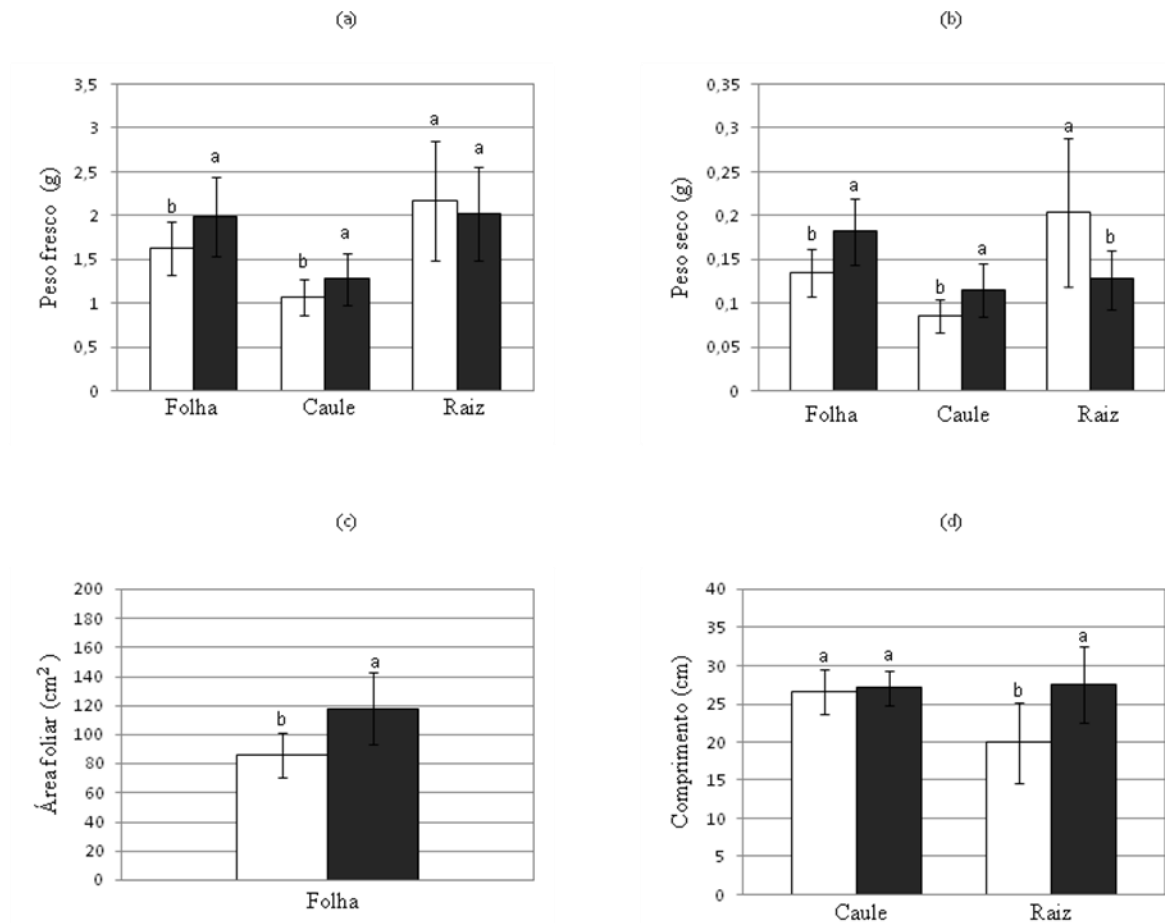


FIGURA 5- Efeito do ácido abscísico (ABA) sobre o peso fresco (a), peso seco (b), área foliar (c) e comprimento (d) em plantas de *Vigna unguiculata* cv. Pitiúba. As medidas de folha, caule e raiz foram realizadas após 15 dias de germinação das sementes em ausência (□) e presença de ABA 0,1 μ M (■). Os valores expressam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

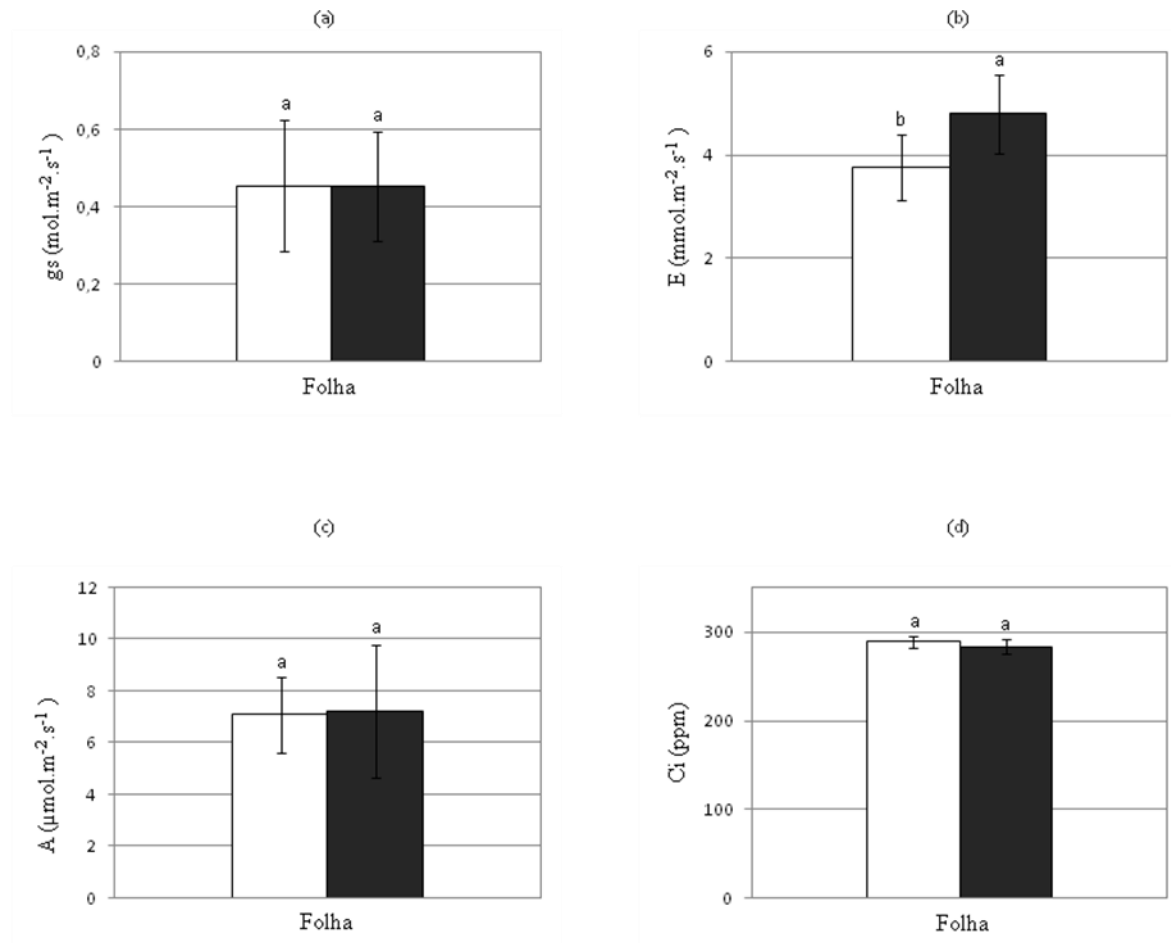


FIGURA 6- Efeito do ácido abscísico (ABA) na condutância estomática (a), na taxa de transpiração (b), na taxa fotossintética (c) e na concentração interna de CO_2 (d) em plantas de *Vigna unguiculata* cv. Pitiúba. As medidas nas folhas foram realizadas após 15 dias de germinação das sementes em ausência (□) e presença de ABA 0,1 μM (■). Os valores expressam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

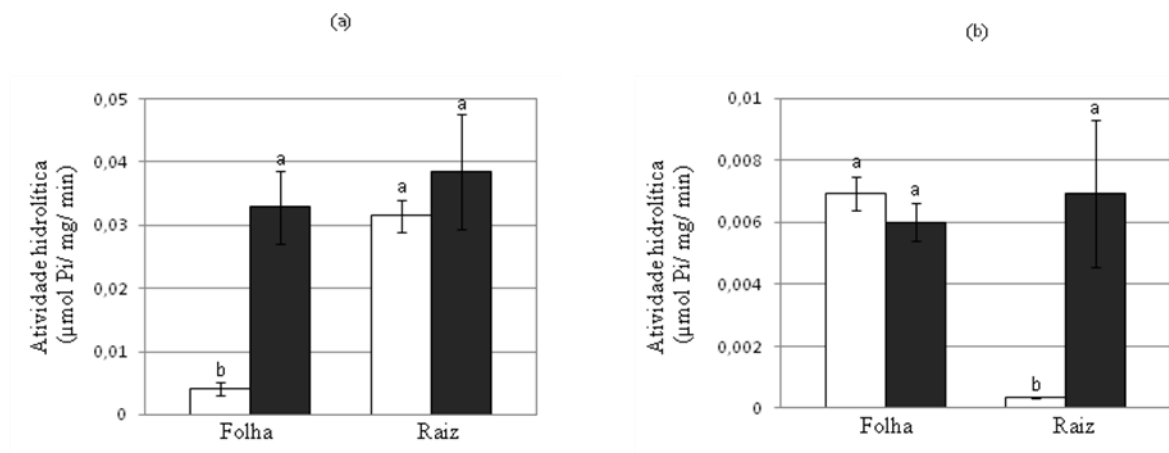


FIGURA 7- Efeito do ácido abscísico (ABA) nas atividades de hidrólise da V-ATPase (a) e da V-PPase (b) no extrato total de folhas e de raízes de plantas de *Vigna unguiculata* cv. Pitiúba. As folhas e as raízes foram coletadas após 15 dias de germinação das sementes em ausência (□) e presença de ABA 0,1 µM (■). As atividades de hidrólise da V-ATPase (a) e da V-PPase (b) foram expressas em µmolde Pi/mg/min. Os valores expressam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.4 Avaliação da expressão de genes

A fim de analisar se o ácido abscísico (ABA) adicionado externamente em plantas de *V. unguiculata* poderia modificar a expressão de genes que codificam a V-PPase e a subunidade A da V-ATPase, as folhas e as raízes de cada condição (controle e ABA 0,1 μM) foram coletadas 15 dias após a germinação e os níveis de transcritos foram determinados pelo método de RT-PCR com *primers* específicos de *V. unguiculata* para a V-PPase, para a subunidade A da V-ATPase e para a actina, utilizada como gene constitutivo (Figura 8).

Os resultados da RT-PCR são apresentados como a imagem do gel (Figura 8a) e como uma proporção do sinal do gene da subunidade A da V-ATPase (Figura 8b) e da V-PPase (Figura 8c) em relação ao sinal do gene da actina. Foi demonstrado que o tratamento das plantas com 0,1 μM de ABA teve efeito sobre o nível dos genes das bombas de prótons. O tratamento com ABA 0,1 μM aumentou o nível do RNAm da V-PPase (24,63%) e da subunidade A da V-ATPase (39,34%) em folhas de feijão-caupi, enquanto que, nas raízes, este tratamento não teve efeito na expressão do gene da V-PPase, mas diminuiu a expressão do gene da subunidade A da V-ATPase aproximadamente 49,05% em relação ao controle.

5.5 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

A fim de determinar os efeitos do ácido abscísico sobre a atividade das enzimas antioxidantes em folhas e raízes de plantas de *Vigna unguiculata* cv. Pitiúba com 15 dias de germinação, na condição controle e tratada com ABA 0,1 μM , as atividades da superóxido dismutase (SOD), da catalase (CAT) e da ascorbato peroxidase (APX) foram medidas e são mostradas na figura 9.

A atividade da SOD em folhas e em raízes de plantas tratadas com ABA 0,1 μM não apresentou efeito significativo quando comparada ao controle (Figura 9a), já a atividade da CAT foi aumentada em 67,39 % em folhas e em 104,06 % em raízes de plantas tratadas com ABA 0,1 μM quando comparada ao controle (Figura 9b). A atividade da APX de folhas e de raízes não foi afetada significativamente por ABA 0,1 μM quando comparada ao controle (Figura 9c).

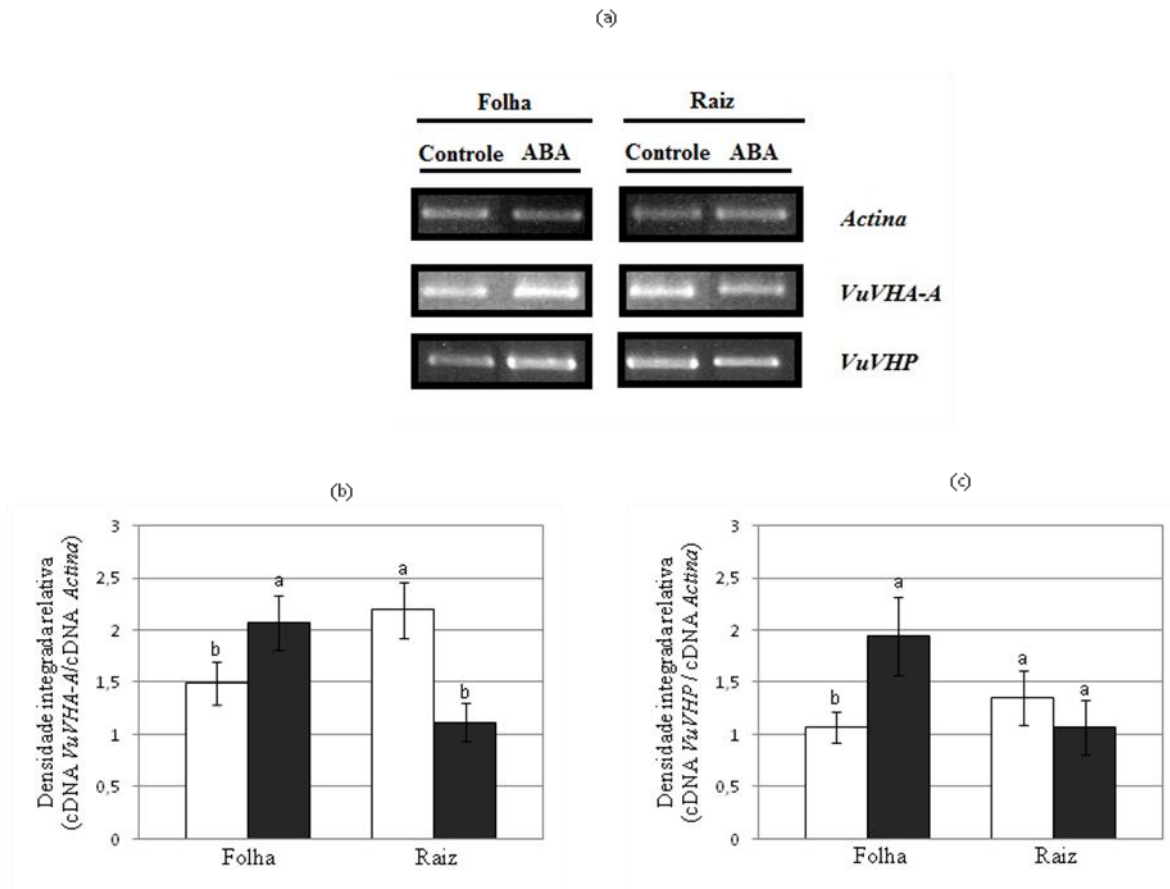


FIGURA 8 - Análise de transcritos de *VuVHA-A* e de *VuVHP* em folhas e raízes de plantas de *Vigna unguiculata* cv. Pitiúba. As folhas e as raízes foram coletadas após 15 dias de germinação das sementes em ausência (□) e presença de ABA 0,1 μ M (■). (a) RT-PCR dos produtos de *VuVHA-A*, *VuVHP* e *Actina* em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. (b) Quantidade relativa de transcritos de *VuVHA-A* obtida através de uma relação de densidades integradas das bandas de cDNA de *VuVHA-A* e de cDNA de *Actina*. (c) Quantidade relativa de transcritos de *VuVHP* obtida através de uma relação de densidades integradas das bandas de cDNA de *VuVHP* e de cDNA de *Actina*. Os valores expressam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

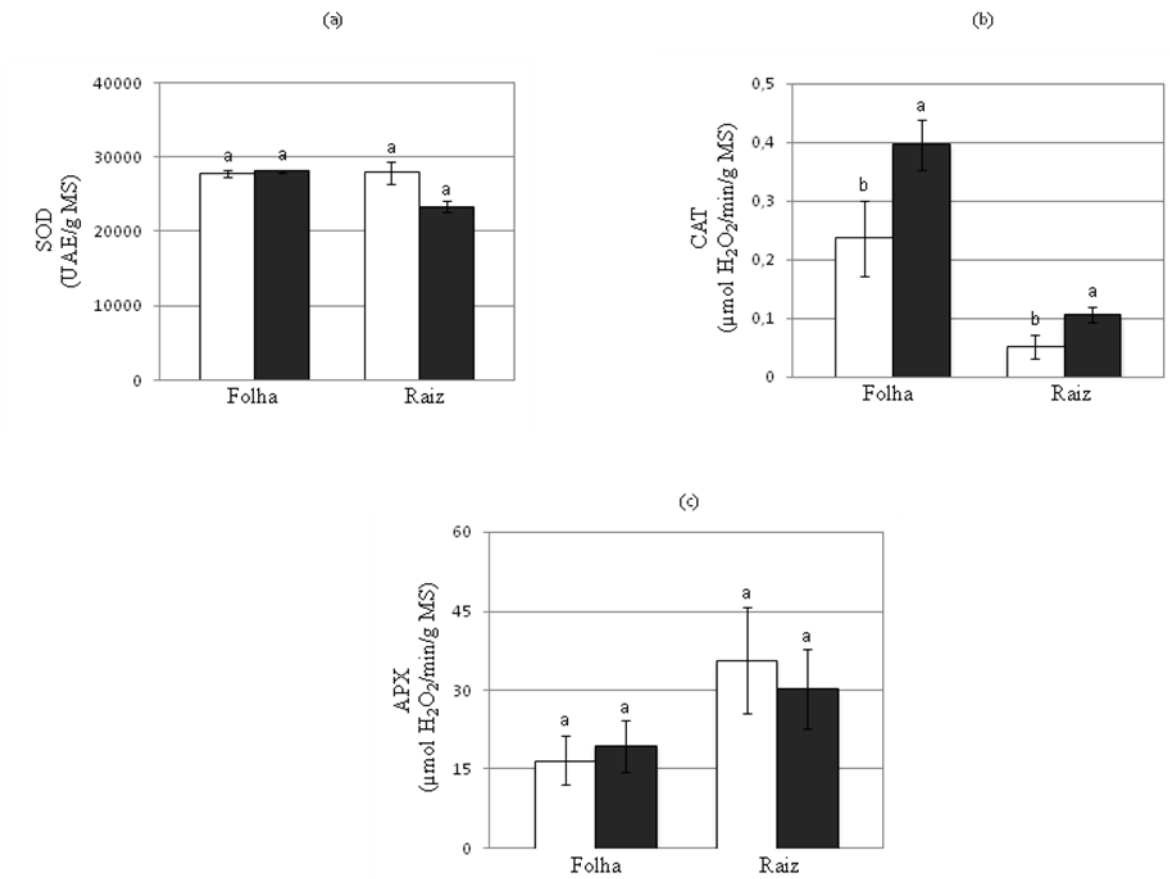


FIGURA 9 - Efeito do ácido abscísico (ABA) na atividade da superóxido dismutase (a), da catalase (b) e da peroxidase do ascorbato (c) no extrato de folhas e de raízes de plantas de *Vigna unguiculata* cv. Pitiúba. As folhas e as raízes foram coletadas após 15 dias de germinação das sementes em ausência (□) e presença de ABA 0,1 μM (■). (a) Atividade da Superóxido dismutase (SOD) expressa em UAE/g MS. (b) Atividade da Catalase (CAT) expressa em μmol H₂O₂/min/g MS. (c) Atividade da Ascorbato peroxidase (APX) expressa em μmol H₂O₂/min/g MS. Os valores expressam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste de Tukey (p < 0,05).

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho estudou-se crescimento, parâmetros fisiológicos, além de respostas bioquímicas e moleculares ao fitohormônio ácido abscísico em plantas de *Vigna unguiculata* após 15 dias de germinação.

Os resultados mostraram que o crescimento radicular e da parte aérea foi estimulado quando as plantas foram expostas a ABA 0,1 μM em relação ao controle (Figura 5). O ácido abscísico regula o crescimento radicular e aéreo (TAIZ; ZEIGER, 2002), o que sugere uma maior eficiência no desenvolvimento das plantas quando este fitohormônio é usado. Com um amplo espectro de ações em diferentes escalas de organização da planta, o ABA pode vir a ter efeitos contraditórios sobre um processo de integração, como o crescimento da folha, dependendo do ambiente ou do contexto de desenvolvimento. De fato, a literatura sobre os efeitos de ABA no crescimento da folha ao nível de planta é contraditória, com efeitos positivos ou negativos, dependendo das condições experimentais (SHARP, 2002).

Em algumas circunstâncias, o ABA tem mostrado que promove ou inibe o crescimento da parte aérea das plantas (PARENT et al., 2009; SHARP et al.; 2000, THOMPSON et al., 2007). Thompson et al. (2007) mostraram que tomates mais produtores de ABA tiveram maior área foliar que plantas controle, além de uma maior condutividade hidráulica da raiz, sugerindo que o turgor aumentado foi responsável pelo crescimento. Plantas superprodutoras de ABA, no entanto, apresentaram redução no crescimento da parte aérea (TUNG et al., 2008). Sharp et al. (2000) demonstraram que o ABA pode manter o crescimento da parte aérea pela baixa produção de etileno, o que é significativo, dado o papel do etileno na inibição do crescimento da parte aérea e das raízes das plantas. Entretanto, Dodd et al. (2009) determinaram que a biossíntese de ABA pode atuar promovendo diretamente o desenvolvimento da área foliar através de um mecanismo desconhecido etileno-independente.

A aplicação de ABA 0,1 μM não afetou significativamente os parâmetros fisiológicos em plantas (Figura 6). Esses dados corroboram com o esperado, pois como a condutância estomática não foi afetada, a fotossíntese, a transpiração e a concentração interna de CO_2 também não poderiam ser afetados, pois um parâmetro está relacionado a outro. Além disso, provavelmente esse perfil reflete uma medida atrasada dos parâmetros, desde que essas medidas foram realizadas 5 dias após a última aplicação de ABA.

A nível celular, considerando que o vacúolo tem função de preenchimento de espaço, além de outras funções, que são essenciais para o crescimento da célula ao lado da regulação da pressão de turgor (MAESHIMA, 1996), foi investigado o efeito do ABA nas

bombas de prótons vacuolares, V-ATPase e V-PPase, em folhas e em raízes de plantas de *Vigna unguiculata* após 15 dias de germinação. A regulação das atividades da V-ATPase e da V-PPase por fitormônios está bem descrita na literatura associada apenas a condições de estresse, mas poucos relatos mostraram o efeito de hormônios vegetais *per si* sobre as bombas de prótons vacuolares. Neste trabalho, observou-se que a aplicação exógena de ABA induziu um aumento nas atividades hidrolíticas da V-ATPase (Figura 7a) e da V-PPase (Figura 7b) em relação ao controle. No entanto, esse aumento foi pronunciado diferencialmente nos tecidos das plantas. A atividade hidrolítica da V-ATPase foi maior apenas em folhas, enquanto a atividade da V-PPase foi aumentada somente em raízes. Esses resultados demonstram que existe uma regulação tecido-dependente entre as bombas de prótons vacuolares. Essa regulação tecido-dependente poderia ser atribuída à disponibilidade de substrato (ATP ou PPi) desde que folhas poderiam gerar ATP como produto fotossintético, diferentemente das raízes. Além disso, a prevalência de V-PPase em tecidos em desenvolvimento suporta a idéia de que o significado fisiológico dessa enzima seria manter o gradiente de prótons sob condições de suprimento limitado de ATP e que o PPi pode servir como recurso energético durante os estágios de desenvolvimento de células de raiz. Assim, duas enzimas com a mesma função coexistindo numa mesma organela oferecem indícios de que elas podem atuar em tempos, tecidos ou maneiras diferentes de acordo com as condições ambientais ou de desenvolvimento. Diversas hipóteses são sugeridas para a existência de duas bombas numa mesma membrana: a) a V-PPase agiria como uma alternativa (“back-up”) para a V-ATPase em condições em que o fornecimento de ATP seja limitado; b) que a V-PPase é reversível e pode usar o gradiente de H^+ que se estabelece através do tonoplasto para sintetizar PPi; ou c) que a energia livre, dissipada como calor por uma PPase solúvel, pode ser conservada como gradiente de prótons se a V-PPase agir como bomba *in vivo* (LEIGH; POPE; JENNINGS, 1992).

Façanha; Meis (1998) verificaram que a V-ATPase foi mais ativa que a V-PPase em coleóptilos, enquanto a V-PPase foi claramente dominante em sementes de *Zea mays*. De acordo com esses autores, esses achados refletem o significado fisiológico dessas enzimas em diferentes tecidos a diferentes estágios de desenvolvimento e/ou diferenciação. Uma regulação diferencial da V-ATPase em células e em tecidos específicos foi observada por Gollmack; Dietz (2001) em resposta ao estresse salino. Eles também encontraram que os níveis de transcritos e de proteínas provavelmente refletem o envolvimento de vários tipos de células e tecidos na manutenção da homeostase pela V-ATPase.

O aumento da atividade da V-ATPase de plantas quando expostas ao ABA tem sido descrito diversas vezes (BARKLA et al., 1999; FUKUDA; TANAKA, 2006; JANICKA-RUSSAK; KLOBUS, 2007; KASAI et al., 1993). O tratamento com NaCl ou ABA de plantas adultas de *Mesembryanthemum crystallinum* induziu a atividade de transporte de H⁺ da V-ATPase de vesículas de tonoplasto isoladas de folhas e, quando aplicados em combinação, um efeito adicional na estimulação da V-ATPase foi observado. Em contraste, o tratamento de plantas jovens com ABA não induziu a atividade da V-ATPase, enquanto o tratamento com NaCl resultou em uma resposta semelhante à observada em plantas adultas (BARKLA et al., 1999). Janicka-Russak; Klobus (2007) mostraram que o tratamento por 24 h de mudas com 50 mmol/dm³ de ABA aumentou a atividade das bombas de prótons nas membranas vacuolar e plasmática. No entanto, quando ABA foi adicionado ao meio reacional, nenhuma mudança nas atividades das ATPases foi observada. Tem sido demonstrado que a atividade da V-PPase aumenta em plantas cultivadas com fitohormônios. O ABA e o 2,4-D (auxina) tem um efeito estimulante sobre as atividades do antiporte Na⁺ / H⁺ e das bombas de prótons de vesículas de tonoplasto isoladas a partir de raízes de cevada (FUKUDA; TANAKA, 2006). Em geral, parece que as respostas das bombas de prótons a fitohormônios dependem da espécie de planta e do tipo de tratamento, não podendo ser generalizada. De acordo com esses dados, os resultados deste trabalho mostraram que a atividade hidrolítica da V-ATPase e da V-PPase de plantas de *V. unguiculata* foram modificadas em resposta ao fitohormônio ácido abscísico.

Quanto aos transcritos (Figura 8), foi mostrado que ABA aumentou a expressão dos genes das duas bombas de prótons em folhas e diminuiu a expressão do gene da subunidade A da V-ATPase em raízes em relação ao controle. O aumento da expressão do gene da subunidade A da V-ATPase por ABA está correlacionado com o aumento da atividade hidrolítica da V-ATPase em folhas de plantas de *V. unguiculata* com 15 dias de germinação. Além disso, a atividade hidrolítica da V-PPase não foi aumentada por ABA em folhas, mas os transcritos de *VuVHP* foram estimulados por esse fitohormônio. Entretanto, não é possível dizer neste trabalho que o aumento das atividades é devido ao aumento na expressão gênica das bombas de prótons vacuolares, pois ambas as análises foram pontuais. Porém, esses resultados fazem perceber que existe uma mudança a nível enzimático e /ou molecular nas bombas de prótons vacuolares com a aplicação de ABA em plantas com 15 dias de desenvolvimento especificamente e que estas mudanças são tecido-dependentes.

Alguns relatos sobre os efeitos de ABA na expressão dos genes para a V-PPase e subunidades da V-ATPase foram demonstrados (BINZEL; DUNLAP, 1995; FUKUDA; TANAKA, 2006; JANICKA-RUSSAK; KLOBUS, 2007; NARASIMHAN et al., 1991).

Fukuda; Tanaka (2006), trabalhando com raízes de cevada, mostraram que ABA induziu marcadamente a expressão de *HVP1* e aumentou ligeiramente a expressão de *HVP10* e de *HvVHA-A*. Em contraste, 2,4-D só aumentou a expressão de *HVP1* e GA3 não teve nenhum efeito significativo sobre qualquer gene. O nível máximo de transcritos *HVP1* em resposta a esses hormônios também foi muito maior do que os níveis de transcritos *HVP10* e *HvVHA-A*. Janicka-Russak; Klobus (2007) mostraram que o tratamento de mudas com 50 mmol/dm³ de ABA ou 200 mmol/dm³ de NaCl elevou significativamente o nível de mRNA da H⁺-ATPase de membrana plasmática em raízes de pepino e que nenhum tratamento teve uma influência significativa sobre o nível de mRNA da subunidade A da V-ATPase de tonoplasto. O aumento dos níveis de transcritos da subunidade A da V-ATPase em resposta ao estresse salino não parecem ser mediado por ABA em *Lycopersicon esculentum* (BINZEL; DUNLAP, 1995). Em contraste, Narasimhan et al. (1991) mostraram que o tratamento com ABA aumentou os níveis de transcritos da subunidade A da V-ATPase em células de *Nicotinum tabacum*. Além do gene da V-ATPase, a região promotora de um gene da V-PPase (*OVPI*) de *Oryza sativa* incluindo o elemento ACGT foi mostrado estar envolvido na regulação da expressão gênica em resposta ao ABA (SAKAKIBARA et al., 1999). Esses resultados indicam que ABA pode regular a expressão de genes da V-ATPase e da V-PPase. Os achados do presente estudo reforçam a hipótese de que ABA tem efeitos significativos sobre a expressão dos genes da V-PPase e da subunidade A da V-ATPase. Trabalhos futuros sobre a regulação da expressão de *HVP1*, *HVP10* e *VHA-A* por ABA deverão explorar a presença de elementos responsivos à esse fitohormônio nos promotores desses genes.

A inter-relação entre o ácido abscísico (ABA) e a as atividades de várias enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX) foi investigada em folhas e raízes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) com 15 dias de germinação (Figura 9). Os resultados mostraram que ABA induziu um aumento na atividade da catalase (Figura 9b), porém não na superóxido dismutase (Figura 9a) e peroxidase do ascorbato (Figura 9c). Estes dados mostram que o aumento da capacidade de defesa antioxidante pode ser devido a alterações metabólicas mediadas pelos fitohormônios que levam a um aumento nos níveis endógenos de EROS.

Sabe-se que o estresse salino gera espécies reativas de oxigênio e que ABA é considerado como um sinal de condição de estresse. Assim, estudo com folhas de plantas de *V. unguiculata* sob estresses salino e osmótico, condições que normalmente apresentam altos níveis de ABA, mostrou que as enzimas superóxido dismutase e peroxidase não promoveram proteção contra o estresse oxidativo gerado pela salinidade (CAVALCANTI et al., 2004).

Além disso, de acordo com Cavalcanti et al. (2007), a atividade da SOD de raízes de *V. unguiculata* diminuiu com a exposição de plantas a 200 mM NaCl por 12 dias. Similarmente, os resultados do presente trabalho revelaram que ambas as enzimas SOD e APX não foram importantes contra um possível estresse oxidativo causado por ABA na ocasião em que suas atividades não foram alteradas em folhas e em raízes de *V. unguiculata*. Por outro lado, a atividade da catalase aumentou em ambos os tecidos. De fato, estudos prévios têm mostrado que o gene para a catalase (*Cat 1*) é expresso durante a embriogênese e é também induzido por ABA exógeno *in vitro*. Entretanto ainda não é claro se ABA é o maior fator para a expressão de *Cat 1 in vivo* (GUAN; ZHAO; SCANDALIOS, 2000).

Foi documentado que ABA pode provocar um aumento da atividade das enzimas antioxidantes, como SOD, CAT, APX e GR nos tecidos de plantas (ANDERSON et al., 1994; BELLAIRE et al., 2000; BUENO et al., 1998; JIANG; ZHANG, 2001; PRASAD; ANDERSON; STEWART, 1994), principalmente em situações de estresse hídrico. Tem sido proposto que as alterações observadas nos transcritos de SOD e CAT e as atividades das suas isoenzimas em resposta ao tratamento com ABA podem ser causadas, pelo menos em parte, pelas atividades metabólicas alteradas de células que levam a mudanças nos níveis das espécies reativas de oxigênio (EROS) (GUAN; SCANDALIOS, 1998a, b; GUAN; ZHAO; SCANDALIOS, 2000). Assim, a aplicação de ABA pode ser viável para o desenvolvimento das plantas já que elas ficam protegidas de possíveis situações de estresse pela alta atividade das enzimas antioxidantes. Além disso, várias linhas de experimentos serão necessárias para obter uma melhor compreensão da interação ABA-EROS.

7 CONCLUSÃO

As plantas de *Vigna unguiculata* cv. Pitiúba tratadas com o fitohormônio ácido abscísico (ABA), coletadas 15 dias após a germinação, apresentaram aumento significativo nos parâmetros de crescimento, não sendo observadas mudanças nos parâmetros fisiológicos. O ABA induziu aumento nas atividades de hidrólise das bombas de prótons vacuolares revelando regulação diferencial entre tecidos: V-ATPase mais ativa em folhas e V-PPase em raízes. Dentre as enzimas antioxidantes estudadas (SOD, CAT e APX), em folhas e raízes de *V. unguiculata*, a catalase foi a que respondeu contra possível estresse oxidativo causado por ABA.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMAS, J.P.; LESLIE, A.G.; LUTTER, R.; WALKER, J.E.; Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. **Nature**, v.370, p. 621–628, 1994.

ALBACETE, A.; GHANEM, M.E.; MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C.; ACOSTA, M.; SÁNCHEZ-BRAVO, J.; MARTÍNEZ, V.; LUTTS, S.; DODD, I.C., PÉREZ-ALFOCEA, F. Hormonal changes in relation to biomass partitioning and shoot growth impairment in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. **J Exp Bot** v.59, p. 4119-4131, 2008.

ALSHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **J Exp Bot** v.53, p. 1331-1341, 2002.

ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; MARTIN, B.A.; STEWART, C.R. Differential gene expression in chilling-acclimated maize seedlings and evidence for the involvement of abscisic acid in chilling tolerance. **Plant Physiol** v.105, p.331-339, 1994.

BARKLA, B.J.; VERA-ESTRELLA, R.; MALDONADO-GAMA, M.; PANTOJA, O. Abscisic acid induction of vacuolar H⁺-ATPase activity in *Mesembryanthemum crystallinum* is developmentally regulated. **Plant Physiol** v.120, p. 811-819, 1999.

BELLAIRE, B.A.; CARMODY, J.; BRAUD, J.; GOSSETT, D.R.; BANKS, S.W.; LUCAS, M.C.; FOWLER, T.E. Involvement of abscisic acid dependent and -independent pathways in the up-regulation of antioxidant enzyme activity during NaCl stress in cotton callus tissue. **Free Radical Research** v. 33, p. 531-545, 2000.

BEYENBACH, K. W.; WIECZOREK, H.. The V-type H⁺-ATPase: Molecular structure and function, physiological roles and regulation. **J Exp Biol**, v. 209, p. 577–589, 2006.

BINZEL, M.L.; DUNLAP, J.R. Abscisic acid does not mediate NaCl-induced accumulation of 70-kDa subunit tonoplast H⁺-ATPase message in tomato. **Planta** v.19, p. 563-568, 1995.

BLAKE-PALMER, K. G.; SU, Y.; SMITH, A. N.; KARET, F. E. Molecular cloning and characterization of a novel form of the human vacuolar H⁺-ATPase e-subunit: An essential proton pump component. **Gene**. v. 393(1/2), p.94–100, 2007.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K.V. Antioxidants, oxidative and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Bot.** v.91, p.179–194, 2003.

BLUMWALD, E.; AHARON, G. S.; APSE, M. P. Sodium transport in plant cells. **Biochim Biophys Acta**. v. 1465, p. 140-151, 2000.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** v.43, p. 83-116, 1992.

BUENO, P.; PIQUERAS, A.; KUREPA, J.; SAVOUREÂ, A.; VERBRUGGEN, N.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. **Plant Sci** v.138, p.27-34, 1998.

CARYSTINOS, G.D., MACDONALD, H.R., MONROY, A.F., DHINDSA, R.S.; POOLE, R.J. Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. **Plant Physiol** v.108, p. 641– 649, 1995.

CAVALCANTI F.R.; LIMA J.P.M.S; FERREIRA-SILVA S.L.; VIÉGAS R.A.; SILVEIRA J.A.G. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. **J. Plant Physiol** v. 164 (5), p.591-600, 2007.

CAVALCANTI F.R.; OLIVEIRA J.T.A.; MARTINS-MIRANDA A.S.; VIÉGAS R.A.; SILVEIRA J.A.G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist** v. 163, p. 563–571, 2004.

CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany** v. 3, p.1-10, 2008.

CHOLODNY, N. Beitrage zur analyse der geotropischen reaction. Jarbuch fur Wissenschaftliche Botanik v. 65, p. 447-459, 1926.

CHRISTMANN, A.; WEILER, E.W.; STEUDLE, E.; GRILL, E. A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. **The Plant Journal** v.52, p.167–174, 2007.

CIPRIANO, D. J.; WANG, Y.; BOND, S.; HINTON, A.; JEFFERIES, K. C.; QI, J.; FORGAC, M. Structure and regulation of the vacuolar ATPases. **Biochim Biophys Acta** v.1777, p. 599–604, 2008.

COLOMBO, R.; SERRANA, R., Enhanced activity of tonoplast pyrophosphatase in NaCl-grown cells of *Daucus carota*. **J Plant Physiol** v.142, p. 226–229, 1993.

COSTA, J.H.; HASENFRATZ-SAUDER, M-P; PHAM-THI, A.T.; SILVA LIMA, M.G.; DIZENGREMEL, P.; JOLIVET, Y. et al. Identification in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. of two cDNAs encoding mitochondrial alternative oxidase orthologous to soybean alternative oxidase genes *2a* and *2b*. **Plant Sci** v. 9, p.167-233, 2004.

COSTA, J.H., MOTA, E.F., CAMBURSANO, M.V., LAUXMANN, M.A., DE OLIVEIRA L.M., SILVA LIMA, M. da G., ORELLANO, E.G., FERNANDES de MELO, D. Stress-induced co-expression of two alternative oxidase (*VuAox1* and *2b*) genes in *Vigna unguiculata*. **J Plant Physiol** v.167(7), p.561-70, 2010.

DAVIES, P.J. Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. 2ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 833p., 1995.

DAVIES, W.J.; ZHANG, J. Root signals and the regulation of ABA signalling and antioxidant defence of growth and development of plants in drying soil. **Ann Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol** v. 42, p.55-76, 1991.

DEL RIO, L.A.; PASTORI, G.M.; PALMA, J.M.; SANDALIO, L.M.; SEVILLA, F.; CORPAS, F.J.; JIMENEZ, A.; LOPEZ-HUERTAS, E.; HERNANDEZ, J.A. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. **Plant Physiol** v.116, p. 1195-1200, 1998.

DIETZ, K.J.; TAVAKOLI, N.; KLUGE, C.; MIMURA, T.; SHARMA, S.S.; HARRIS, G.C.; CHARDONNENS, A.N.; GOLLDACK, D. Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. **J. Exp. Bot.** v. 363, p. 1969-1980, 2001.

DODD, I.C.; THEOBALD, J.C.; RICHER, S.K.; DAVIES, W.J. Partial phenotypic reversion of ABA-deficient *flacca* tomato (*Solanum lycopersicum*) scions by a wild-type rootstock: normalising shoot ethylene relations promotes leaf area but does not diminish whole plant transpiration rate. **J Exper Bot** v. 60, p. 4029–4039, 2009.

DUTRA, A.S.; TEÓFILO, E.M. Envelhecimento acelerado para avaliar o vigor de sementes de feijão caupi. **Revista Brasileira de Sementes** 2006. doi: 10.1590/S0101-31222007000100027.

FAÇANHA, A.R.; MEIS, L. de. Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. **Plant Physiol** v.116, p.1487–1495, 1998.

- FENG, Y.; FORGAC, M. Inhibition of vacuolar H⁺-ATPase by disulfide bond formation between cysteine 254 and cysteine 532 in subunit A. **J. Biol. Chem.** v. 269, p.13224–13230, 1994.
- FERY, R.L. Development of improved southern pea varieties for the southern United States: an update on the usda effort. **Vegetable Association Yearbook**, p. 53, 2002.
- FISKE, C.F.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Bio. Chem.** v. 66, p. 375- 379, 1925.
- FOYER, C.; DESCOURVIERES, P.; KUNERT, K. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanisms studied in transgenic plants. **Plant Cell Environment** v.17, p. 507-523, 1994.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytol.** v.146, p.359–388, 2000.
- FUKUDA, A., TANAKA, Y. Effects of ABA, auxin, and gibberellin on the expression of genes for vacuolar H⁺-inorganic pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiport in barley. **Plant Physiol Biochem** v. 44, p.351-358, 2006.
- GAXIOLA, R.A.; PALMGREN, M.G.; SCHUMACHER, K. Plant proton pumps. **FEBS Letters** v.581, p. 2204–2214, 2007.
- GOLLDACK, D.; DIETZ, K.J. Salt-induced expression of the vacuolar H⁺-ATPase in the common ice plant is developmentally controlled and tissue specific. **Plant Physiol.** v.125, p. 1643–1654, 2001.
- GRABOV, A.; BLATT, M.R Co-ordination of signalling elements in guard cell ion channel control. **J Exp Bot** v. 49, p. 351-360, 1998.
- GRANT, J.J.; AND LOAKE, G.J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiol** v.124, p. 21-29, 2000.
- GUAN, L.; SCANDALIOS, J.G. Characterization of the catalase antioxidant defense gene Cat 1 of maize and its developmentally regulated expression in transgenic tobacco. **The Plant Journal** v.3, p. 537-546, 1993.

GUAN, L.; SCANDALIOS, J.G. Cis-elements and transactors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is likely intermediary signaling molecule for the response. **The Plant Journal** v.22, p. 87–95, 2000.

GUAN, L.; SCANDALIOS, J.G. Effects of the plant growth regulator abscisic acid and high osmoticum on the developmental expression of the maize catalase genes. **Physiologia Plantarum** v. 104, p. 413-422, 1998b.

GUAN, L.; SCANDALIOS, J.G. Two structurally similar maize cytosolic superoxide dismutase genes, *Sod4* and *Sod4A*, respond differentially to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiol* v. 117, p. 217-224, 1998a.

GUAN, L.; ZHAO, J.; SCANDALIOS, J.G. Cis-elements and transactors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signalling molecule for the response. **The Plant Journal** v. 22, p. 87-95, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine. p. 543, 1989.

HARTUNG, W. The site of action of abscisic acid at the guard cell plasmalemma of *Valerianella locusta*. **Plant Cell Environ** v. 6, p.427-428, 1983.

HERNANDEZ, J.A.; JIMENEZ, J.; MULLINEAUX, P.; SEVILLA, F. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term stress is associated with induction of antioxidant defences. **Plant Cell Environ**. v.23, p.583–862, 2000.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **Calif Exp Stn Circ** v.347, p.1–39, 1938.

HU, X.; JIAN, G.M.; ZHANG, A.; LU, J. Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. **Planta** v.223, p. 57–68, 2005.

HU, X.; JIAN, G.M.; ZHANG, J.; ZHANG, A.; LIN, F.; TAN, M. Calcium/ calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and function both upstream and downstream of H₂O₂. **New Phytologist** v.173, p.27-38, 2007.

Produção de cereais, leguminosas e oleaginosas. Destaques na estimativa de fevereiro em relação a janeiro. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2011. Disponível em http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1835&id

_pagina=1. Acessado em: 17 de fevereiro de 2011.

IQBAL, A.; KHALIL, I.A.;ATEEQ, N.; KHAN, M.S. Nutrition quality of important food legumes. **Food Chem.** v.97, p.331-335, 2006.

JANICKA-RUSSAK, M.; KLOBUS, G. Modification of plasma membrane and vacuolar H⁺-ATPase in response to NaCl and ABA. **J Plant Physiol** v.164, p. 295-302, 2007.

JIANG, M.; ZHANG, J. Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiol* 42:1265-1273, 2001.

JIANG, M.; ZHANG, J. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. **J Exp Bot** v. 53, p. 2401-2410, 2002.

KABAŁA, K.; KŁOBUS, G. Modification of vacuolar proton pumps in cucumber roots under salt stress. **Plant Physiol.**, 2008 doi:10.1016/j.jplph.2008.01.003.

KANE, P.M. The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 70, p.177-191, 2006.

KASAI, M., YAMAMOTO, Y., MAESHIMA, M., MATSUMOTO, H. Effects of in vivo treatment with abscisic acid and/or cytokinin on activities of vacuolar H⁺ pumps of tonoplast-enriched membrane vesicles prepared from barley roots. **Plant Cell Physiol** v.34, p. 1107-1115, 1993.

KAWAMURA, Y; ARAKAWA, K; MAESHIMA, M; YOSHIDA S. ATP analogue binding to the A subunit induces conformational changes in the E subunit that involves a disulfide bond formation in plant V-ATPase. **Plant Cell Physiol** v. 268(10), p. 2801-2809, 2001.

KLUGE, C.; LAHR, J.; HANITZSCH, M.; BOLTE, S. GOLLDACK, D.; DIETZ, K.J. New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar V-ATPase. **J. Bioenerg. Biomamb.** v. 35, p. 377-388, 2003.

LEIGH, R.A.; POPE, A.J.; JENNINGS, I.R. Kinetics of the vacuolar H⁺-pyrophosphatase: the roles of magnesium, pyrophosphate, and their complexes as substrates, activators, and inhibitors. **Plant Physiol.** v. 100 , p. 1698-1705, 1992.

LENINGHER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica*- 3ªed. São Paulo: SARVIER, 2000.

LI, J.; KINOSHITA, T.; PANDEY, S.; NG, C.K.-Y.; GYGI, S.P.; SHIMAZAKI, K.-I.; ASSMANN, S.M. Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. **Nature** v.418, p. 793–797, 2002.

LI, J.S.; YANG, H.; PEER, W.A. et al. *Arabidopsis* H⁺-PPase *AVP1* regulates auxin-mediated organ development. **Science** v. 310, p.121-125, 2005.

LIANG, J., ZHANG, J.; WONG, M.H. Can stomatal closure ABA and leaf growth caused by xylem ABA explain the inhibition of leaf photosynthesis under soil drying? **Photosynthesis Research** v.51, p. 149–159, 1996.

LOGAN, H.; BASSET, M.; VERY, A. A.; SETENAC, H. Plasma membrane transport system in higher plants: From black boxes to molecular physiology. **Plant Physiol.** v. 100, p.1, 1997.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p.265-275, 1951.

LUTTEG, U.; SMITH, J.A.C.; MARIGO, G.; OSMOND, C.B. Energetics of malate accumulation in the vacuoles of *Kalanchoe tubiflora* cells. **FEBS Lett.** v.126, p. 81-84, 1981.

MAESHIMA M., YOSHIDA S. Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. **J. Biol Chem.** v. 264, p. 20068-20073, 1989.

MAESHIMA, M. In vacuolar H⁺-pyrophosphatase. **Biochim Biophys Acta**, v.1465, p. 37-51. 2000.

MAESHIMA, M. Tonoplast transporters: Organization and function. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 52, p. 469-497, 2001.

MAESHIMA, M.; NAKANISHI, Y.; MATSUURA-ENDO, C.; TANAKA, Y. Proton pumps of the vacuolar membrane in growing plant cells. **J. Plant Res.** v. 109, p. 119-125, 1996.

MARTINOIA, E, MAESHIMA, M, NEUHAUS, H.E. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. **J Exp Bot.** v. 58(1), p.83-102, 2007.

MEHDY, M.C.; SHARMA, Y.K.; SATHASIVAN, K.; BAYS, N.W. The role of activated oxygen species in plant diseases resistance. **Physiol Plant** v.98, p.365-374, 1996.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science** v.9, p. 405-410, 2002.

NAGEL, O.W.; KONINGS, H.; LAMBERS, H. Growth rate, plant development and water relations of the ABA-deficient tomato mutant *sitiens*. **Physiologia Plantarum** v.92, p. 102-108, 1994.

NARASIMHAN M.L.; BINZEL, M.L.; PEREZ-PRAT, E.; CHEN, Z.; NELSON, .DE.; SINGH, N.K.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. NaCl regulation of tonoplast ATPase 70-kilodalton subunit mRNA in tobacco cells. **Plant Physiol** v. 97, p. 562-568, 1991.

NAVARRO-AVIÑÓ, J.P.; BENNETT, A.B. Role of a Ca²⁺-ATPase induced by ABA and IAA in the generation of specific Ca²⁺ signals. **Biochem Biophys Research Commun** v. 329, p.406-415, 2005.

O'NEILL, S.D.; BENNETT, A.B.; SPANSWICK, R.M. Characterization of a NO³⁻ – sensitive H⁺-ATPase from corn roots. **Plant Physiol**. v.72, p. 837-846, 1993.

OZOLINA, N.V.; PRADEDOVA, E.V.; SALYAEV, R.K. Phytohormone effects on hydrolytic activity of phosphohydrolases in red beet (*Beta vulgaris* L.) tonoplasts. **Plant Growth Regul** v. 19, p.189-191, 1996.

PARENT, B.; HACHEZ, C.; REDONDO, E.; SIMONNEAU, T.; CHAUMONT, F.; TARDIEU, F. Drought and abscisic acid effects on aquaporin content translate into changes in hydraulic conductivity and leaf growth rate: a trans-scale approach. **Plant Physiol** v. 149, p. 2000–2012, 2009.

PRASAD, T.K.; ANDERSON, M.D.; STEWART, C.R. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. **Plant Physiol** v. 105, p.619-627, 1994.

RATAJCZAK, R. Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase. **Biochim Biophys Acta**. v. 1465, p. 17-36, 2000.

REA, P.A.; POOLE, R.J. Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mo1 Biol** v.44, p.157-180, 1993.

RIZHSKY L., LIANG H.J. & MITTLER R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant Physiol** v.130, p.1143–1151, 2002.

SAKAKIBARA, Y.; KASAMO, K.; KOBAYASHI, H.; KUSAKABE, I.; KAWASAKI, S. Identification of the gene structure and promoter region of H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase in rice (*Oryza sativa* L.). **Biochim Biophys Acta** v.1444, p. 117-124, 1999.

SAKAMOTO, A.; OKUMURA, T.; KAMINATA, H.; SUMI, K.; TANAKA, K. Structure and differential response to abscisic acid of two promoters for the cytosolic copper/zinc-superoxide dismutase genes, *SodCc1* and *SodCc2*, in rice protoplasts. **FEBS Letters** v.358, p. 62-66, 1995.

SAKIHAMA, Y.; COHEN, M. F.; GRACE, S. C.; YAMASAKI, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology** v.177, p. 67-80, 2002.

SAUTER, A.; DIETZ, K.J.; HARTUNG, W. A possible stress physiological role of abscisic acid conjugates in root-to shoot signaling. **Plant Cell Environ** v.25, p. 223-228, 2002.

SAUTER, A.; HARTUNG, W. Radial transport of abscisic acid conjugates in maize roots: its implication for long distance stress signals. **J Exper Bot** v.51, p.925-935, 2000.

SCANDALIOS, J.G. Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1992.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiol** v.101, p.7-12, 1993.

SHARP, R.E. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. **Plant, Cell and Environment** v.25, p. 211–222, 2002.

SHARP, R.E.; LENOBLE, M.E.; ELSE, M.A.; THORNE, E.T.; GHERARDI, F. Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. **J Exper Bot** v. 51, p. 1575–1584, 2000.

SHARP, R.E.; LENOBRE, M.E. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. **J Exper Bot**, v.153, p.33-37, 2002.

SHI, H.; ZHU, J-K. Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid. **Plant Mol Biol** v.50, p. 543-550, 2002.

SIDDIQUI, N.U.; CHUNG, H.J.; THOMAS, T.L.; DREW, M.C. Abscisic acid dependent and independent expression of the carrot late-embryogenesis abundant- class gene *Dc3* in transgenic tobacco seedlings. **Plant Physiol** v.118, p.1181-1190, 1998.

SILVA, F. de A. S. e. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. **Anais...** Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.

SILVA, G.S. Nematóides. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: EMBRAPA, 2005, cap. 13. p.487-497.

SINGH, B.B.; MOHAN, R.; DASHIELL, K.E. Advances in cowpea research – copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agriculture Sciences (JIR CAS). **IITA, Ibadan, Nigeria. Prepared for Publication by Sayce Publishing, Devon, UK, 1997.**

SMITH, D.A.; BLACK, C.C. Measurement of the pyrophosphate content of plant tissues. **Plant Physiol** v.75, p. 862 – 864, 1984.

SPOLEN, W.G.; LENOBRE, M.E.; SAMUELS, T.D.; BERNSTEIN, N.; SHARP, R.E. Abscisic Acid Accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. **Plant Physiol** v.122, p.967- 976, 2000.

TAIZ L, ZEIGER E. *Plant Physiology*. 3rd ed. Massachusetts: Sinauer Associates. 690p., 2002.

TAL, M. Abnormal stomatal behavior in wilted mutants of tomato. **Plant Physiol** v. 41, p.1387-1391, 1966.

TAYLOR, I.B.; BURBIDGE, A.; THOMPSON, A.J. Control of abscisic acid synthesis. **J Exper Bot**, v.51, p. 1563-1574, 2000.

THOMPSON, A.J.; ANDREWS, J.; MULHOLLAND, B.J. *et al.* Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. **Plant Physiol** v. 143, p. 1905–1917, 2007.

THOMPSON, A.J.; JACKSON, A.C.; SYMONDS, R.C.; MULHOLLAND, B.J.; DADSWELL, A.R.; BLAKE, P.S.; BURBIDGE, A.; TAYLOR, B. Ectopic expression of tomato 9-cisepoxycarotenoid dioxygenases gene causes over-expression of abscisic acid. **The Plant Journal** v.23, p. 363-374, 2000.

TREWAVAS, A.J.; CLELAND, R.E. Is plant development regulated by changes and the concentration of growth substances or by changes in the sensitivity to growth substances? **Trends in Biochemical Sciences**, v.8, p.354-357, 1983.

TUNG, S.A.; SMEETON, R.; WHITE, C.A.; BLACK, C.R.; TAYLOR, I.B.; HILTON, H.W.; THOMPSON, A.J. Over-expression of LeNCED1 in tomato (*Solanum lycopersicon* L.) with the rbcS3C promoter allows recovery of lines that accumulate very high levels of abscisic acid and exhibit severe phenotypes. **Plant, Cell and Environ** v.31, p. 968–981, 2008.

VERCOURT, B. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the "Flora of Tropical East Africa" IV. -- **Kew Bull.** v. 24 (3) , p. 507-569, 1970.

WANG, B.; LÜTTGE, U.; RATAJKZAK, R. Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. **J. Exp. Bot.** v.52, p. 2355-2365, 2001.

WANG, Y.; LEIGH R.A.; KAESTNER, K.H. Electrogenic H⁺-pumping pyrophosphatase in tonoplast vesicles of oat roots. **Plant Physiol.** v. 81, p. 497- 502, 1986.

WENT FW. On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. **Proc. Kon. Akad. Wetensch (Amsterdam)**, v. 30, p.10–19, 1926.

WILLIAMSON, J.D.; SCANDALIOS, J.G. Differential responses of maize catalase and superoxide dismutases to the photoactivated fungal toxin cercosporin. **Plant J** v. 2, p. 351–358, 1992b.

XIONG, L.; ZHU, J.K. Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis. **Plant Physiol** v.133, p. 29-36, 2003.

YU, X-C.; LI, M-J.; GAO, G-F.; FENG, H-Z. et al. Abscisic acid stimulates a calcium-dependent protein kinase in grape berry. **Plant Physiol** v.140, p. 558-579, 2006.

ZHANG, A.; JIANG, M.; ZHANG, J.; TAN, M.; HU, X. Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. **Plant Physiol** v.141, p.475-487, 2006.

ZHAO Q., ZHAO YAN-JUN. ZHAO BAO-CUN., GE RONG-CHAO., LI M., SHEN YIN-ZHU., HUANG ZHANG-JING. Cloning and functional analysis of wheat V-H⁺-ATPase subunit gene. **Plant Mol Biol** v. 69, 33-46, 2009.

ZHU, D.; SCANDALIOS, J. G. Differential accumulation of manganese - superoxide dismutase transcripts in maize in response to abscisic acid and high osmoticum. **Plant Physiol** v.106, p. 173–178, 1998.