

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

AS BOMBAS DE PRÓTONS DO
TONOPLASTO DE HIPOCÓTILOS DE
Vigna unguiculata (L.) WALP E SUA
PARTICIPAÇÃO NO ESTRESSE SALINO

Maria de Lourdes Oliveira Otoch

N.Cham. T 574.192 O96b

Autor: Otoch, Maria de Lourdes Oliv

Título: As bombas de prótons do tonopla



1343513

Ac. 48049

BCT

PORTALEZA - CEARÁ

1999

AS BOMBAS DE PRÓTONS DO
TONOPLASTO DE HIPOCÓTILOS DE
Vigna unguiculata (L.) WALP E SUA
PARTICIPAÇÃO NO
ESTRESSE SALINO

MARIA DE LOURDES OLIVEIRA OTOCH

Tese apresentada à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica
da Universidade Federal do Ceará, para a
obtenção do Título de **Doutor em
Bioquímica**, área de concentração em
Bioquímica Vegetal.

FORTALEZA - CEARÁ
1999

UFC/BU/BCT 03/11/2000



R1343513
C650510
T574.192

As bombas de protons do
tonoplasto de hi

O96b

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O96b Otoch, Maria de Lourdes Oliveira.
As bombas de prótons do tonoplasto de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp e sua participação no estresse salino / Maria de Lourdes Oliveira Otoch. – 1999.
184 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 1999.
Orientação: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo.
1. Bioquímica. I. Título.

CDD 572

**AS BOMBAS DE PRÓTONS DO
TONOPLASTO DE HIPOCÓTILOS DE
Vigna unguiculata (L.) WALP E SUA
PARTICIPAÇÃO NO
ESTRESSE SALINO**

MARIA DE LOURDES OLIVEIRA OTOCH

ORIENTADORA : Prof^a. Dr^a. Dirce Fernandes de Melo

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

**FORTALEZA
1999**

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Universidade.

A transcrição de qualquer texto desta Tese será permitida desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Maria de Lourdes Oliveira Otoch

TESE APROVADA EM: 10 de setembro de 1999

Dr.^a Dirce Fernandes de Melo
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientadora

Dr.^a Elena Graciela Orellano
Departamento de Ciências Biológicas
Universidade Nacional de Rosário
Conselheiro

Dr.^a Maria Erivalda Farias de Aragão⁰
Departamento de Biologia
Universidade Estadual do Ceará
Conselheiro

Dr. Eneás Gomes Filho
Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

Dr.^a Maria da Guia da Silva Lima
Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

*Ao meu esposo Sérgio
e aos meus filhos
Sérgio Filho e Pedro*

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível graças à colaboração de várias pessoas e instituições. Agradeço em especial:

A Prof^ª. Dirce Fernandes de Melo pela confiança depositada, sua valiosa orientação e estímulo constante;

A Prof^ª. Maria da Guia Silva Lima pelas importantes sugestões e constante apoio. Pelo seu exemplo de determinação e perseverança que muito me ajudaram na elaboração desse trabalho;

A Prof^ª. Elena Graciela Orellano pelas análises e sugestões de grande importância neste trabalho, bem como pelo incentivo nos momentos difíceis;

Ao Prof. Enéas Gomes Filho, pela presteza no seu atendimento e suas opiniões de grande utilidade nas diversas etapas desse trabalho;

A Prof^ª. Maria Erivalda Farias de Aragão, pelo encorajamento e sugestões tão bem vindas a esse trabalho;

Ao Dr. Lev Okorokov pelos ensinamentos sobre isolamento de vesículas enriquecidas de tonoplasto e por iniciar-me no estudo das ATPases e PPases vacuolares;

A Prof^ª. Denize, pelo seu incansável espírito de ajuda;

Aos colegas Adeílido e Hélio, que com grande habilidade técnica muito me ajudaram na preparação das figuras desse trabalho;

A Alana, pela sua dedicação integral ao trabalho, como bolsista de Iniciação Científica e agradável convivência, e a Janaína, Ariane e Luciana que compartilharam do início desse trabalho, enfrentando as primeiras dificuldades;

Aos colegas Izabel, Ana Cláudia, Isabella, Désireé, Márcia, Maria Lúcia, Érika, Márcio, Evando e Jarbas pelo apoio e por proporcionarem horas de descontração tão necessárias;

Aos colegas Eti, Otávio e Carmem, pela colaboração em muitos momentos;

Ao Prof. Albérico, por ter aberto as portas do laboratório de Virologia possibilitando a execução de várias etapas do trabalho;

A minha família pelo apoio e incentivo constante;

A todos que de alguma forma contribuíram possibilitando a conclusão desse trabalho;

A Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas de estudo.

SUMÁRIO

Conteúdo	Páginas
I. LISTA DE FIGURAS	ix
II. LISTA DE TABELAS	xiv
III. ABREVIATURAS	xv
IV. RESUMO	xvi
V. ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	7
2.2. Vacúolo	9
2.3 - Sistema De Transporte Nos Vacúolos	15
2.4 - Bombas Eletrogênicas de Próton	15
2.5 - V-H⁺-ATPase	17
2.5.1 - Estrutura e Composição das V-H ⁺ -ATPases	19
2.5.2. Microscopia Eletrônica	26
2.5.3. Regulação	28
2.5.4. Ação de Inibidores	33
2.5.5. Isoformas	36
2.5.6. Evolução da H ⁺ -ATPase Vacuolar	36
2.5.7. Ontogenia das V-ATPases	39
2.6. V-H⁺-PPase	42
2.6.1. Caracterização Inicial	42
2.6.2. Atividade e distribuição	43
2.6.3. PPi como fonte de Energia	44
2.6.4. Estrutura	45
2.6.5. Função Catalítica	46

2.6.6. Origem	49
2.7. Estresse nas Plantas	50
2.7.1. Estresse salino	52
2.8. Efeito da Salinidade nos Estágios Iniciais de Desenvolvimento da Planta	56
2.9. Mudanças nas Bombas Vacuolares Durante o Crescimento Celular	58
3. OBJETIVOS	60
4. MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1. Material	61
4.1.1. Sementes	61
4.2. Métodos	61
4.2.1. Germinação	61
4.2.2. Isolamento de Vesículas Enriquecidas de Tonoplasto Complexo de Golgi e do Reticulo Endoplasmático	62
4.2.3. Isolamento de Mitocôndrias	63
4.2.4. Isolamento de vesículas enriquecidas de tonoplasto	64
4.2.5. Determinação da proteína de tonoplasto, do Complexo de Golgi e do Reticulo Endoplasmático	68
4.2.6. Determinação da Proteína Mitocondrial	68
4.2.7. Medida da Atividade de Hidrólise da V-ATPase e H ⁺ -PPase	69
4.2.8. Determinação do transporte de prótons pela V-ATPase e H ⁺ -PPiase	71
4.2.9. Determinação da Atividade Hidrolítica da ATPase mitocondrial	72
4.3. Parâmetros de crescimento	73
4.4. Dosagem de elementos minerais (Na⁺ e K⁺)	73
4.5. Deteminação de Malondialdeido	74
4.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Contendo SDS	75
4.7. Western blot	77
5. RESULTADOS	82
5.1. Localização das bombas de prótons (V-ATPase e H⁺-PPase) nas distintas endomembranas.	82

5.2. Propriedades funcionais e de regulação das bombas de prótons (V-ATPase e H⁺-PPase) vacuolares	84
5.2.1. Atividades de hidrólise da H ⁺ -ATPase e H ⁺ -PPase vacuolares	84
5.2.2. Atividade de transporte de prótons da H ⁺ -ATPase e da H ⁺ -PPase	92
5.3. Parâmetros indicativos do estresse salino em 2 cultivares de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp (Vita 3 e Vita 5) com diferentes graus de tolerância ao NaCl.	107
5.3.1. Análise visual dos efeitos de concentrações crescentes de NaCl sobre o crescimento de plântulas de <i>Vigna unguiculata</i>	107
5.3.2. Análise visual dos efeitos da salinidade em dois tempos após a semeadura	107
5.3.3. Medidas de crescimento e relação raiz/parte aérea	108
5.3.3.1. Determinação da relação raiz/parte aérea	108
5.3.3.2. Crescimento das raízes	110
5.3.3.4. Determinação do incremento da relação raiz/parte aérea	110
5.3.3.5. Determinação das massas seca e fresca e do teor de água das plântulas, dos hipocótilos e das raízes	110
5.3.4. Dosagem de Elementos Minerais (Na ⁺ e K ⁺)	116
5.4. Funcionamento das bombas de prótons ao longo do tempo de germinação	116
5.4.1. A atividade de hidrólise da V-ATPase e da H ⁺ -PPase de tonoplastos de hipocótilo de plântulas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	116
5.4.2. A atividade hidrolítica da ATPase mitocondrial, da V-ATPase e da H ⁺ -PPase de plântulas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp cv. Vita 5 com 3 e 7 dias de germinação	120
5.5. Participação das bombas de prótons vacuolares (V-ATPase e H⁺-PPase) no estresse salino	122
5.5.1. Atividade hidrolítica da V-ATPase e da PPase de hipocótilos de plântulas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp cv. Vita 5 com 3 e 7 dias de germinação, em presença de NaCl 100 mM	122
5.5.2. Atividade de transporte de prótons da V-ATPase e da PPase de hipocótilos de plântulas de <i>Vigna unguiculata</i> cv. Vita 5 com 3 e 7 dias de germinação, em presença de NaCl 100 mM	124
5.5.3. Determinação da quantidade relativa de proteínas das subunidades A e B da V-ATPase e da Pirofosfatase de membranas vacuolares de hipocótilos de plântulas de	

<i>Vigna unguiculata</i> cv. Vita 5 com 3 e 7 dias de germinação, em presença de NaCl 100 mM _____	124
5.5.4. Determinação do teor de malondialdeído nas frações de membranas vacuolares de hipocótilos de plântulas de <i>Vigna unguiculata</i> cv. Vita 5 com 3 e 7 dias de germinação, em presença de NaCl 100 mM _____	130
6. DISCUSSÃO _____	132
7. CONCLUSÃO _____	143
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	144

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Visão geral do sistema de transporte em tonoplasto de plantas.	16
Figura 2. Diagrama das subunidades da V-ATPase encontrada em diferentes materiais vegetais.	23
Figura 3. Modelo e dimensões dos domínios V_1 e V_0 da V-ATPase de <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> em condições de controle e de estresse.	27
Figura 4. Relação filogenética entre archaeobactérias, eubactérias e eucariontes e organelas endossimbiontes (mitocôndrias e cloroplastos) derivadas a partir de comparações de subunidades das H^+ -ATPases.	38
Figura 5. Modelo de síntese, distribuição e atividade da V-ATPase.	41
Figura 6. Modelo hipotético da topologia de membrana da H^+ -PPase vacuolar.	47
Figura 7. Esquema de extração de mitocôndrias.	65
Figura 8. Esquema de isolamento de vesículas enriquecidas de tonoplasto.	67
Figura 9. Esquema da sequência de montagem do conjunto para transferência de proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose.	78
Figura 10. Atividade de hidrólise e de transporte de prótons da V-ATPase e da H^+ -PPase em distintas endomembranas detectadas em células de hipocótilos de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura.	83
Figura 11. Atividade de hidrólise da V-ATPase e da H^+ -PPase em função da temperatura em hipocótilo de <i>Vigna unguiculata</i> cv. Vita 5 germinada em condições controle durante 7 dias.	86

- Figura 12.** Atividade de hidrólise da V-ATPase e da H⁺-PPase de vesículas enriquecidas de tonoplasto de hipocótilo de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura. 87
- Figura 13.** Efeito de íons na atividade de hidrólise da V-ATPase e da PPase de hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5. 89
- Figura 14.** Efeito do Mg₂SO₄ na atividade de hidrólise da V-ATPase e da H⁺-PPase de hipocótilo de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 em condições controle. 90
- Figura 15.** Efeito do nitrato na atividade de hidrólise da ATPase de hipocótilo de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 em condições controle. 91
- Figura 16.** Efeito da concentração de ATP na atividade de hidrólise da V-ATPase e da concentração de PPI na atividade de hidrólise da H⁺-PPase de vesículas de tonoplasto de hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 após 7 dias de germinação. 93
- Figura 17.** Efeito da temperatura na atividade de transporte de prótons da ATPase e da H⁺-PPase em vesículas vacuolares de hipocótilo de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. 95
- Figura 18.** Efeito do pH na atividade de transporte de prótons da V-ATPase e da H⁺-PPase de tonoplasto de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5 após 7 dias de germinação. 96
- Figura 19.** Efeito de diferentes íons (Na⁺, K⁺, Li⁺ e Cs⁺) sobre as atividades de transporte de prótons da V-ATPase e da H⁺-PPase de tonoplasto de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, após 7 dias de germinação. 97
- Figura 20.** Efeito do Magnésio na atividade de transporte de prótons da V-ATPase de hipocótilo de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 germinada em condições controle durante 7 dias. Foram aplicadas diferentes concentrações de 99

MgSO₄, 1 mM, 4 mM e 10 mM com uma concentração fixa de 1 mM de ATP em função do pH.

Figura 21. Efeito do Magnésio na atividade de transporte de prótons da H⁺-PPase de hipocótilo de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 germinada em condições controle durante 7 dias. Foram aplicadas diferentes concentrações de MgSO₄ com uma concentração fixa de 0,1 mM de PPI. 100

Figura 22. Efeito dos inibidores Bafilomicina A e Nitrato na atividade de transporte de prótons da V-ATPase e do inibidor Imidodifosfato na atividade de transporte de prótons da H⁺-PPase de vesículas de tonoplasto de hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura. 102

Figura 23. Efeito da concentração de ATP na atividade de transporte de prótons da V-ATPase e da concentração de PPI na atividade de transporte de prótons da H⁺-PPase de vesículas de tonoplasto de hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura. 103

Figura 24. Foto de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 3 e cv. Vita 5 em condições de controle e de diferentes concentrações de NaCl, após 7 dias de semeadura. 104

Figura 25. Foto de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Vita 3 crescidas em condições de controle e em presença de NaCl 100 mM, após 3 e 7 dias de semeadura. 105

Figura 26. Foto de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Vita 5 crescidas em condições de controle e em presença de NaCl 100 mM, após 3 e 7 dias de semeadura. 106

Figura 27. Comprimento das raízes de Vita 3 e Vita 5 em condições controle e em presença de NaCl 100 mM. 111

- Figura 28.** Incremento da relação raiz/parte aérea de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Vita 3 e Vita 5 após 3 e 7 dias de semradura em presença de NaCl 100 mM. 112
- Figura 29.** Teor de Na⁺ em raízes, epicótilos e hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 3 e cv. Vita 5 em condições controle e em presença de NaCl 100 mM. 117
- Figura 30.** Relação K⁺/Na⁺ em raízes, epicótilos e hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 3 e cv. Vita 5 em condições controle e em presença de NaCl 100 mM. 118
- Figura 31.** Atividade de hidrólise da V-ATPase e da H⁺-PPase de tonoplasto de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 3 e cv Vita 5 germinadas em condições controle. 119
- Figura 32.** Atividade de hidrólise da ATPase mitocondrial, V-ATPase e H⁺-PPase de tonoplasto de hipocótilo de plântulas após 3 e 7 dias de germinação e de epicótilo de plântulas com 7 dias de semeadura de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5. 121
- Figura 33.** Atividade de hidrólise da V-ATPase e H⁺-PPase de tonoplasto de hipocótilo de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 semeadas em condições controle e de estresse salino (NaCl 100 mM) durante 3 e 7 dias. 123
- Figura 34.** Transporte de prótons da V-ATPase e da H⁺-PPase de vesículas de tonoplasto de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 em condições de controle e em presença de NaCl 100 mM, após 3 e 7 dias de semeadura. 125
- Figura 35.** Quantidade relativa da subunidade A da V-ATPase em membranas vacuolares de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5. 126
- Figura 36.** Quantidade relativa da subunidade B da V-ATPase em membranas vacuolares de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5. 128

Figura 37. Quantidade relativa da H^+ -PPase em membranas vacuolares de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5.

Tabela 1

Tabela 2

Tabela 3

Tabela 4

Tabela 5

Tabela 6

Tabela 7

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Classificação das ATPases.	18
Tabela 2. Subunidades da V-H ⁺ -ATPase de plantas superiores.	21
Tabela 3. Respostas fisiológicas em células de plantas superiores.	29
Tabela 4. Parâmetros de crescimento de plântulas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp cv. Vita 3 e cv. Vita 5 após 3 e 7 dias de semeadura em condições de controle e de estresse salino (NaCl 100 mM).	109
Tabela 5. Matéria fresca, matéria seca e teor de água da raiz, hipocótilo, epicótilo e folha de plântulas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) WALP. cv. Vita 3 após 3 e 7 dias de semeadura em condições de controle e de estresse salino.	113
Tabela 6. Matéria fresca, matéria seca e teor de água da raiz, hipocótilo, epicótilo e folha de plântulas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. cv. Vita 5 após 3 e 7 dias semeadura em condições controle e de estresse salino.	114
Tabela 7. Teor de malondialdeído nas frações de membranas vacuolares de hipocótilos de plântulas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp cv. Vita 5 após 3 e 7 dias de semeadura.	131

ABREVIATURAS

- ACMA** – 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (sonda fluorescente sensível a mudança de pH)
- BTP** – Bis-tris-propano (1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino)-propano)
- DTT** – ditioneitol
- EDTA** – Ácido etileno diamino tetra-acético
- EGTA** – Etileno glicol-bis (β -aminoetil eter) N,N,N',N' - ácido tetraacético
- FCCP** – Carbonil cianeto P-trifluorometoxifenilhidrazona)
- HEPES** – [N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfônico)
- K_m** – Constante de Michaelis-Menten
- MES** – Ácido 4-morfolino-etanosulfônico
- MOPS** – Ácido 3-(N-morfino)propano sulfônico
- P_i** – Fosfato inorgânico
- PMSF** – Fluoreto de fenilmetila-sufonila
- PPase** – Pirofosfatase
- PP_i** – Pirofosfato inorgânico
- PVP 40** – Polivinil pirrolidona (P.M. 40)
- SDS** – Sodio dodecil sulfato
- TBA** – Ácido tiobarbitúrico
- TCA** – Ácido tricloroacético
- Tris** – Tris-(hidroximetil)aminometano
- V-ATPase** – ATPase vacuolar

RESUMO

As bombas de prótons transmembranares, H^+ -ATPases e H^+ -PPase, funcionam como mecanismos de transporte primário nas células vegetais e ambas enzimas, geram uma diferença de potencial eletroquímico de prótons através da membrana vacuolar funcionando pelo mecanismo de contra-transporte, H^+ /substrato. No presente trabalho foi feita inicialmente a localização das bombas de prótons, H^+ -ATPases e H^+ -PPase de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 com gradiente de sacarose 25% em vesículas de tonoplasto e outras endomembranas. O funcionamento da H^+ -ATPase e da H^+ -PPase foi avaliado por intermédio das atividades de hidrólise e de transporte de prótons. Foram caracterizados os efeitos da temperatura, do pH, de íons, e de inibidores sobre as mesmas, bem seus parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}). Parâmetros indicativos de estresse salino foram determinados em dois cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, com diferentes graus de tolerância à salinidade (Vita 3, menos e Vita 5 mais tolerante), constatando-se que NaCl 100 mM induzia uma diminuição do crescimento da parte aérea do cultivar mais susceptível de ca. 50%. O funcionamento da ATPase mitocondrial, da V-ATPase e da H^+ -PPase de plântulas do cultivar Vita 5 foi estudado, sendo constatado que as atividades da ATPase mitocondrial e da V-ATPase decrescem ao longo do tempo no hipocótilo e ao cabo de 7 dias no epicótilo. Contrariamente ao que ocorre com a atividade da PPase no hipocótilo que decresce em função do tempo, a atividade da PPase no epicótilo, aumenta. O decaimento da atividade da V-ATPase, ao longo do tempo, estaria ligado ao decaimento da atividade ATPásica mitocondrial no hipocótilo e no epicótilo. O epicótilo sendo o tecido em crescimento (7 dias) utiliza a PPase que é a enzima chave dos processos de crescimento dos tecidos. Foi feita uma

comparação entre as atividades de hidrólise e de transporte de prótons da V-ATPase e da H^+ -PPase de tonoplastos em condições de estresse salino, constatando-se que, após 7 dias de tratamento as atividades da V-ATPase aumentaram enquanto as da PPase decresceram. A análise por western blotting das subunidades A e B da V-ATPase revelou que, a proteína das 2 subunidades aumentou ou decresceu em paralelo com as 2 atividades, enquanto a proteína da PPase apresentou um padrão diferente. Os resultados sugerem que, o estresse salino induz uma regulação diferente nas duas bombas de prótons vacuolares durante a elongação do tecido quando comparada ao controle. A V-ATPase e a H^+ -PPase são independentemente reguladas em condições de estresse salino.

ABSTRACT

The transmembrane proton pumps, H^+ -ATPases and H^+ -PPase, work as mechanisms of primary transport in plant cells and both enzymes generate an electrochemical proton potential through the vacuolar membrane functioning by the H^+ /substrate antiporter transport mechanism. In the present work, initially the distribution of the proton pumps, H^+ -ATPases and H^+ -PPase, were determined in different endomembranes of tonoplast from hypocotyl of *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 with a 25 % sucrose gradient. The functioning of H^+ -ATPases and H^+ -PPase has been evaluated through the hydrolytic and proton transport activities. The effects of the temperature, pH, ions, and inhibitors on H^+ -ATPases and H^+ -PPase, as well the kinetic parameters (K_m and V_{max}) have been studied. Indicative parameters of saline stress have been determined in two cultivars of *Vigna unguiculata* (L.) Walp, with different degrees of tolerance to salinity (Vita 3, more tolerant and Vita 5, less tolerant). It has been verified that 100 mM NaCl induced ca. 50 % decrease of the growth of the plant aerial part of the less tolerant cultivar. The activities of the mitochondrial ATPase, V-ATPase and H^+ -PPase from seedling of Vita 5 cultivar were studied. It has been verified that the activities of mitochondrial ATPase and V-ATPase decrease along the time in hypocotyls and in 7-day-old epicotyls. PPase activity of tonoplasts also decreases from 3 to 7 day old hypocotyl but increases in 7-day-old epicotyl. The decline of V-ATPase activity from hypocotyls and epicotyls, along the time, might be correlated to the decrease of mitochondrial ATPase activity. As a growth developing tissue, the 7-day-old epicotyl utilizes PPase that is the key enzyme in the processes of the plant growth and development. A comparison between hydrolytic and proton

transport activities of V-ATPases and H⁺-PPase of tonoplast in salt stress conditions was done and it has been verified that, after 7 days of salt treatment the activities of V-ATPase increased while PPase activities decreased. The western blotting analysis of the A and B subunits of V-ATPase revealed that, the protein content of the 2 subunits increased or decreased according to their activities, while the protein content of PPase presented a different pattern as compared to its activity. The present results suggest that, the saline stress induce a different regulation of the two vacuolar proton pumps during plant tissue elongation as compared to the control. V-ATPase and H⁺-PPase are independently regulated in saline stress conditions.

1. INTRODUÇÃO

Por centenas de anos, o maior problema que enfrenta a agricultura em meios áridos e semi-áridos tem sido o aumento da salinidade no solo, tipicamente associada à uma deficiente irrigação. Quando a água de irrigação contém alta concentração de solutos, ou quando o lixiviamento do solo é limitado, a concentração salina atinge um teor que causa danos às espécies sensíveis ao sal (Flowers *et al.*, 1977). Com o crescente uso da irrigação e o aumento da salinidade nos solos, um maior número de plantas desenvolve-se em ambientes salinos. Como consequência, os especialistas em genética de plantas têm devotado considerável esforço à identificação de cultivares tolerantes ao sal (Shannon, 1985). Embora tenha havido algum sucesso no desenvolvimento de cultivares tolerantes ao sal (Johnson *et al.*, 1991), existe muito pouca informação quanto ao mecanismo molecular que confere tolerância ao sal. O entendimento desses mecanismos poderá finalmente facilitar o desenvolvimento de genótipos tolerantes à salinidade (Noble & Rogers, 1992).

Nos últimos anos, estudos intensivos sobre o mecanismo de resistência ao sal, em plantas, têm sido conduzidos no nível celular, e a importância do controle do transporte de íons através da membrana plasmática e do tonoplasto em plantas adaptadas ao sal tem sido demonstrada (Nakamura *et al.*, 1992). Dentre as diversas espécies cultivadas na região semi-árida do nordeste brasileiro, o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) tem sido bastante estudado com relação ao efeito da salinidade no seu desenvolvimento (Eneas Filho, 1979; Castro, 1982; Gomes Filho *et al.*, 1983; Fernandes de Melo, *et al.*, 1994).

A maioria das espécies vegetais, quando submetidas a altas concentrações de NaCl, tem seu crescimento reduzido. Isso deve-se ao efeito deletério da salinidade que pode induzir estresse hídrico, estresse oxidativo, toxicidade por íons, desequilíbrio iônico ou a combinação de todos esses fatores (Kurth *et al.*, 1986).

O estresse salino resulta primariamente de dois fatores: declínio na entrada de água resultante do aumento da pressão osmótica externa (estresse osmótico) e distúrbios fisiológicos na planta causados pelo desequilíbrio iônico no citoplasma das células vegetais (estresse iônico) (Greenway & Munns, 1980; Flowers *et al.*, 1977).

As células vegetais podem tornar-se adaptadas ao estresse osmótico através do aumento da pressão osmótica interna, um processo que é facilitado pelo acúmulo de solutos no vacúolo. O ajuste osmótico é também uma resposta fundamental da célula ao estresse salino. Acredita-se que os sais responsáveis pela manutenção da osmolaridade na célula são seqüestrados para o vacúolo e o balanço da pressão osmótica do citoplasma com a do vacúolo é compensado pelo acúmulo de solutos orgânicos, como betaínas e prolina no citoplasma (Lone *et al.*, 1987; Binzel *et al.*, 1987).

Muitos processos metabólicos importantes nas células vegetais ocorrem no citoplasma e são afetados por diferentes níveis de vários cátions, como: Na⁺, K⁺, H⁺, Mg²⁺ e Ca⁺. A compartimentalização intracelular dos íons é um importante componente da adaptação ao sal em células vegetais. Já é amplamente aceito que a morte das células vegetais expostas às condições salinas deve-se a alta relação Na⁺/K⁺ no citoplasma, decorrente do drástico aumento da entrada do íon Na⁺ na célula reforçado com a saída dos íons K⁺ (Katsuhara & Tazawa, 1986). A capacidade das células vegetais de sobreviverem

às condições salinas pode ser resumida como a capacidade de manter as condições iônicas normais (alto K^+ , baixo Na^+ , pH neutro, etc.) no citoplasma das células.

As plantas possuem vários mecanismos para controlar a concentração citoplasmática de Na^+ , como o seqüestro de Na^+ para o interior do vacúolo através do contra transporte de Na^+/H^+ no tonoplasto (Blumwald & Poole, 1987) e sua expulsão através da membrana plasmática pelo mecanismo de troca Na^+/H^+ (Katz *et al.*, 1986; Watad *et al.*, 1986).

O controle do transporte de íons através da membrana plasmática e do tonoplasto é o fator chave na tolerância ao sal pelas células vegetais. Em plantas tolerantes ao sal como as halófitas e algumas glicófitas, a existência de mecanismos que regulam a concentração de íons (Na^+ e Cl^-) no citossol e seu acúmulo nos vacúolos, é considerada de importância crucial na adaptação às condições salinas (Flowers *et al.*, 1977; Greenway & Munns, 1980).

Tem sido observado que a expansão celular com as adaptações citomorfológicas à presença de NaCl facilita o acúmulo de íons para o ajuste osmótico (Binzel *et al.*, 1988). Isso inclui taxas reduzidas de expansão celular e do volume celular final que diminuiria o fluxo total de íons através do citossol e também diminuiria o conteúdo absoluto de íons por célula. O aumento da relação volume do citoplasma/volume do vacúolo iria depois reduzir a quantidade de íons acumulada, necessária por célula, para estabelecer o ajuste osmótico. Quanto maior a superfície membrana por volume celular, especialmente a superfície do tonoplasto, maior é a capacidade das células de manter grandes "pools" de íons durante o crescimento. Essas mudanças na geometria celular não iriam por si mesma favorecer a relação saída/entrada de íons, mas iriam diminuir o tempo necessário para encher e

esvaziar um compartimento (baseado na direção do fluxo líquido). Porém, é provável que a tolerância ao sal envolva adaptações na membrana que afetem a permeabilidade e facilitem o transporte de íons (Reuveni *et al.*, 1990).

A capacidade da planta de sobreviver e crescer em condições salinas envolve uma integração de mecanismos celulares adaptativos multicelulares e intracelulares. É problemático, senão impossível, conhecer precisamente a contribuição relativa de cada tipo de mecanismo de tolerância ao sal em plantas. Porém, os mecanismos de importância crucial são aqueles mecanismos celulares de adaptação que facilitam o ajuste osmótico, que medeiam o acúmulo de íons e a compartimentalização intracelular (Binzel *et al.*, 1988).

A capacidade de manter uma relação relativamente alta de K^+/Na^+ no citoplasma e a de seqüestrar NaCl para fora dos sítios do metabolismo celular, são dois dos mais críticos requerimentos para que haja crescimento da planta em condições salinas (Wyn Jones, 1981). Embora não se conheça o exato mecanismo responsável por facilitar a entrada dos íons Na^+ e Cl^- no vacúolo, já está claro que a força próton motriz para esse transporte é o gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu H^+$) gerado pelo transporte de H^+ através do tonoplasto (Reuveni *et al.*, 1990). A membrana vacuolar (tonoplasto) parece participar em tais mecanismos através do controle do fluxo de íons e solutos dependente de energia (Blumwald, 1987). Esses processos dependem do estabelecimento, no tonoplasto, de um gradiente eletroquímico gerado por duas enzimas translocadoras de prótons distintas que trabalham em paralelo: a V- H^+ -ATPase (Sze *et al.*, 1992) e a H^+ -PPase (Rea & Poole, 1993).

As V- H^+ -ATPases são enzimas oligoméricas, constituídas de 8 a 10 subunidades, localizadas no tonoplasto com o setor catalítico voltado para o citoplasma. Elas possuem

atividade de hidrólise do ATP e de transporte de prótons do citoplasma para o vacúolo. A atividade dessas enzimas é inibida por NO_3^- , estimulada por Cl^- e insensível à azida e oligomicina. A H^+ -PPase é constituída por uma subunidade que se liga ao substrato, de aproximadamente 70 KDa, dependendo da espécie, possui as funções catalíticas tanto de hidrólise de PPi quanto de transporte de prótons e está voltada para o citossol (Kim *et al.*, 1994).

Vários trabalhos foram realizados nos últimos anos com o intuito de determinar o efeito do NaCl nas atividades da H^+ -ATPase e H^+ -PPase de tonoplasto, porém os resultados mostraram-se contraditórios. Esses trabalhos apresentam resultados de estimulação (Reuveni *et al.*, 1990; Nakamura *et al.*, 1992; Binzel, 1995), de ausência de efeito (Colombo & Cerana, 1993), e de estimulação do transporte de prótons sem alterar a atividade de hidrólise (Ballesteros *et al.*, 1996; Löw e Rausch, 1996) da V-H^+ -ATPase pelo NaCl. A atividade da H^+ -PPase foi inibida por NaCl em raiz de *Vigna radiata* (Nakamura *et al.*, 1992), e estimulada em células de cenoura crescidas em NaCl (Colombo & Cerana, 1993) e em células de *Acer pseudoplatanus* adaptadas ao NaCl (Zingarelli *et al.*, 1994).

Apesar dos intensivos estudos sobre a ATPase do tipo vacuolar, pouco se sabe sobre sua distribuição subcelular em plantas (Herman *et al.*, 1994). Essa bomba de prótons é freqüentemente referida como uma enzima marcadora de vacúolo. Porém, a separação de frações microssomais em gradientes lineares de sacarose e dextrana mostra que a V-H^+ -ATPase está amplamente distribuída nas distintas frações membranares. Vários pesquisadores têm sugerido sua associação tanto com o retículo endoplasmático como com o complexo de Golgi (Churchill *et al.*, 1983). A H^+ -PPase, por sua vez, tem sido considerada marcadora de tonoplasto desde que ela foi primeiramente isolada a partir de vacúolos. Recentes trabalhos têm fornecido evidências para uma localização da H^+ -PPase

também em outras membranas, porém os dois exemplos até agora publicados estão associados ao transporte de sacarose. Esses resultados indicariam que a V-H⁺-ATPase e a H⁺-PPase teriam uma localização e um papel fisiológico mais amplo do que se pensava anteriormente.

No presente trabalho, estudamos as bombas de prótons vacuolares, suas localizações nas endomembranas celulares e o efeito do estresse salino sobre as mesmas. O efeito do estresse salino foi observado durante a elongação do hipocótilo focalizando seu efeito na atividade H⁺-ATPásica e H⁺-PPásica em cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp com diferentes graus de tolerância ao estresse salino.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

A espécie *Vigna unguiculata* é vulgarmente conhecida como feijão-de-corda, feijão fradinho, feijão macassar, feijão de praia e caupí. Trata-se de uma dicotiledônea que pertence a ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, sub-família *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, sub-tribo *Phaseolinae* e gênero *Vigna* (Verdcourt, 1970). O número de espécies de *Vigna* não é preciso, podendo variar de 84 (Maréchal *et al.*, 1978) a 184 (Phillips, 1951) de acordo com os autores. A grande maioria dessas espécies está na África, onde 66 delas são consideradas endêmicas. Isso sugere que o gênero *Vigna* deve ter tido sua evolução ligada a esse continente. Entre as espécies que ocorrem na África está a *Vigna unguiculata* (L.) Walp., a qual tem tido sua origem africana e a localização do seu centro de origem bastante discutidos (Araújo & Watt, 1988).

O feijão-de-corda é considerado de grande importância para o sustento de populações relativamente pobres em países tropicais menos desenvolvidos, por ser dotada de alto conteúdo protéico e pouco exigente em fertilidade do solo (Araújo & Watt, 1988). Ele é utilizado como fonte alimentar de populações animais e/ou humanas além de ser fonte de renda das populações locais. Além do grão, suas folhas e vagens imaturas são usadas como alimento, sendo bastante nutritivos, fornecendo proteínas, vitaminas e minerais. O grão contém em média 23-25% de proteína e 50-67% de amido. O feijão-de-corda é essencial no apoio à produção animal e a 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 spp.*). 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 *et al.*, 1997). Acredita-se que, dadas as grandes qualidades nutricionais, superiores às dos feijões comuns e ao seu relativamente baixo custo de produção, parece extremamente relevante que haja uma maior comercialização e difusão do feijão-de-corda, não só para o Norte e Nordeste do país, como também para as demais regiões, que possuem população com carências protéicas e alimentares (Araújo & Watt, 1988).

A localização precisa do centro de origem do feijão-de-corda tem sido bastante difícil de determinar. 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 *V. unguiculata* selvagem tenha ocorrido no Sul da África. Esta foi difundida por outras partes da África, Europa e Índia e somente trazida para as Américas tropicais por volta do ano 1700 pelos espanhóis junto com o comércio de escravos (Singh *et al.*, 1997).

O feijão-de-corda é a espécie leguminosa mais importante usada como alimento no Centro e Oeste da África, onde mais de 60% do feijão-de-corda mundial é cultivado. Hoje, fora da África, as áreas de maior produção encontram-se na América do Sul e Central, Ásia e várias pequenas áreas espalhadas pela Europa Central, sul dos Estados Unidos e Oceania. No Brasil, a cultura do feijão-de-corda está principalmente nas mãos do pequeno produtor do sertão semi-árido e áreas isoladas da Amazônia (Araújo & Watt, 1988). Essas regiões apresentam boas condições de clima e solo para sua adaptação. O Norte por ser bastante

úmido e o Nordeste, com o clima semi-árido, enquadram-se na faixa de temperatura ideal (entre 18°C e 34°C) para o desenvolvimento do feijão-de-corda (Araújo & Watt, 1988).

A pesquisa do feijão-de-corda recebeu especial atenção do Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) a partir de 1970. Esse Instituto detém o mandato mundial para a pesquisa do feijão-de-corda juntamente com o Grupo de Consultoria para Pesquisa de Agricultura Internacional (CGIAR). O Brasil é um dos poucos países da América do Sul a participar do IITA, e já vem desenvolvendo, desde 1984, sete variedades de feijão-de-corda. O IITA detém inúmeros projetos para selecionar variedades de feijão-de-corda e dentre as variedades mais promissoras na América Latina estão o Vita 3, Vita 5 e Vita 7 (Singh *et al.*, 1997). Em 1980, o Centro Nacional de Pesquisa do Arroz e Feijão (CNPAP) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuárias (EMBRAPA) iniciou um programa de melhoramento do feijão-de-corda, com o objetivo de identificar cultivares tolerantes ao estresse hídrico. A partir desses cultivares, seriam detectadas caracteres de resistência à seca para incorporação futura em cultivares comerciais (Guimarães, 1988). Os cultivares Vita 3, Vita 4 e Tvx 1836-015J foram considerados promissores para a resistência à seca enquanto que o cultivar Vita 5 e outros não se comportaram bem sob deficiência hídrica (Guimarães *et al.*, 1982).

2.2. Vacúolo

Os vacúolos são organelas dinâmicas e proeminentes em células vegetais. Em células de plantas imaturas e não diferenciadas encontra-se, proporcionalmente, mais citoplasma que sistema de endomembranas e numerosos e pequenos provacúolos. Logo após a divisão celular, a célula apresenta-se com centenas de pequenos provacúolos que se originam da fusão de vesículas do trans-complexo de Golgi (Marty, 1978). Nesse ponto do

desenvolvimento, o vacúolo de plantas assemelha-se aos lisossomos de animais tanto em quantidade quanto em tamanho. Durante a expansão celular esses pequenos provacúolos fundem-se e formam um vacúolo central. O núcleo e todas as outras organelas citoplasmáticas ficam dispostas numa fina camada entre a membrana plasmática e o tonoplasto.

Com o amadurecimento celular, quando ocorre a fusão desses pequenos provacúolos, o vacúolo central pode chegar a ocupar de 80 a 90% do volume intracelular em células diferenciadas (Herman *et al.*, 1994). Em sementes em desenvolvimento ocorre uma forma especializada de vacúolo chamada de vacúolo armazenador de proteína (PSV – do inglês protein storage vacuole). Tradicionalmente, pensava-se que os PSV resultavam da fragmentação do vacúolo central em decorrência do processo de síntese de proteína de reserva. Porém, baseado nesse modelo ainda não está claro como as proteínas de reserva depositadas recentemente seriam protegidas da degradação pelas proteases ácidas, presentes no vacúolo central (Paris *et al.*, 1996).

A imagem do vacúolo tem mudado nos últimos anos. Inicialmente, tinha-se um modelo único de um vacúolo central que funcionava como depósito de todos os produtos tóxicos da célula. Porém, trabalhos recentes têm mostrado que sais movem-se tanto para dentro como para fora do vacúolo, que eles contêm proteases que funcionam em pH bastante ácido, e que corpos protéicos são formas especializadas do vacúolo. A contraditória coexistência de proteínas intactas e proteases numa mesma organela levou os pesquisadores a buscarem um esclarecimento para tal questão. Em 1996, Paris *et al.* mostraram que o vacúolo único central típico presente nos estágios finais de desenvolvimento celular parece resultar da fusão de 2 tipos de vacúolos que se apresentam nas células como vacúolos múltiplos. Eles estabeleceram a estrutura tridimensional de

compartimentos celulares da ponta da raiz de ervilha, onde as células não foram ainda diferenciadas e o vacúolo central ainda não estava formado. Para isso, utilizaram técnicas de imunofluorescência com anti-soro contra α -TIP ou TIP-Ma 27, proteínas intrínsecas de tonoplasto, para marcar as membranas vacuolares de dois compartimentos diferentes dentro da mesma célula. Seus resultados mostraram que, esses compartimentos eram funcionalmente distintos, devido à lectina de cevada, uma proteína armazenada na ponta de raiz, ser encontrada somente nos compartimentos que continham α -TIP, enquanto a aleurina, uma protease que serve como marcadora para vacúolos acidificados, foi exclusivamente encontrada nos compartimentos contendo TIP-Ma 27. Esses compartimentos também diferiram na forma. Assim, quando foi usado o anti- TIP-Ma 27, 1/3 das células continha compartimentos vacuolares em forma de câmaras esféricas e tubulares distribuídas uniformemente no citoplasma e os 2/3 restantes continham estruturas esféricas pequenas. À medida que as células desenvolviam grandes vacúolos, os dois compartimentos fundiam-se e os produtos de reserva nos compartimentos que continham α -TIP eram submetidos a um meio ácido como também a enzimas hidrolíticas, sugerindo um mecanismo pelo qual a célula mobiliza o conteúdo do PSV para outros usos.

O vacúolo central de células vegetais contém a maior parte do complemento celular de íons orgânicos e uma variedade de metabólitos primários e secundários. A pressão osmótica gerada por esses metabólitos leva a um acúmulo de água no vacúolo, facilitando a expansão celular. Além do seu papel na expansão celular, os vacúolos de planta participam de várias outras importantes funções metabólicas e ecológicas (Boller & Wiemken, 1986), como as indicadas a seguir:

a) Armazenamento de substâncias

Os vacúolos funcionam como locais de armazenamento de várias substâncias. Grandes quantidades de ácidos orgânicos como malato, citrato e oxalato ali são armazenados. Proteínas são ativamente sintetizadas e armazenadas no vacúolo das células das sementes em amadurecimento formando os corpos protéicos. O vacúolo é a localização breve e/ou prolongada de nutrientes para a própria célula e para novos órgãos em crescimento (Maeshima *et al.*, 1996). A maioria dos sabores das frutas e verduras é devida às substâncias armazenadas no vacúolo. Quando necessário, esses metabólitos primários podem ser solicitados do vacúolo e utilizados em vias metabólicas (Taiz, 1992).

b) Eliminação de toxicidade

As substâncias potencialmente tóxicas podem ser transportadas para o vacúolo central, como é o caso de plantas halófitas que são capazes de translocar o excesso de íons Na^+ do citoplasma para o vacúolo (Blumwald & Poole, 1985). Outras substâncias como os metais cádmio, cobalto, zinco e os herbicidas podem tornar-se menos tóxicas quando transportadas para o vacúolo (Taiz, 1992).

c) pH e homeostase iônica

As reações que ocorrem no citosol são particularmente sensíveis a mudanças no pH e na força iônica. O pH do vacúolo de plantas superiores é mais ácido que o do citoplasma, cerca de duas unidades. Em princípio, as bombas de prótons localizadas no tonoplasto são capazes de regular o pH citosólico bombeando prótons do citosol para o interior do vacúolo (Taiz, 1992).

A regulação da composição iônica pelo vacúolo tem sido bastante estudada (Taiz, 1992). Vários íons como o Ca^{2+} , K^+ , Cl^- , malato e fosfato são mantidos na concentração fisiológica dentro do citoplasma devido a constante regulação decorrente do transporte através do tonoplasto (Taiz, 1995).

d) Defesa contra patógenos microbianos e herbívoros

Entram-se nos vacúolos substâncias de sabor amargo como compostos fenólicos, glicosídeos cianogênicos e alcalóides que são capazes de afastar os herbívoros (Taiz & Zeiger, 1991). Outras substâncias como fitoalexinas chegam a inibir certos microrganismos. A quitinase, uma enzima que atua quebrando a parede celular de fungos, é especificamente sintetizada em resposta a uma injúria na planta e então acumulada no vacúolo de feijoeiro (Boller & Vogeli, 1984).

e) Pigmentação

Os vacúolos de tecido foliar concentram pigmentos como antocianinas, flavanóides solúveis em água, responsáveis pelas colorações roxa e vermelho-alaranjada. Esses pigmentos previnem a fotooxidação do aparelho fotossintético reduzindo a intensidade da luz e difundindo a radiação ultravioleta (Taiz, 1992).

f) Hidrólise e reciclagem de componentes celulares

Durante a germinação, as proteínas depositadas nos vacúolos armazenadores de proteína (PSV) são hidrolisadas em aminoácidos pela ação de proteases. Assim, como os lisossomos de células animais, os vacúolos de plantas contêm várias hidrolases ácidas, como proteases, ribonucleases e glicosidades (Boller & Wiemken, 1986).

Em fungos e plantas, durante os períodos de escassez de nutrientes, as organelas intracelulares e o citossol são seqüestrados em autofagossomos que subseqüentemente se fundem com o vacúolo. A função principal desse fagossomo parece ser a de participar da quebra e da reciclagem dos componentes celulares durante a senescência, no caso de folhas ou flores ou durante a morte celular programada, como é o caso dos elementos do xilema (Taiz, 1992).

g) Resistência a drogas através de transportadores multiespecíficos

Os transportadores ABC (“ATP-binding cassette”) multiespecíficos, grupo de transportadores de solutos orgânicos que são diretamente energizados pelo complexo MgATP, compõem uma das maiores famílias de proteínas conhecidas e são responsáveis pelo transporte de uma grande variedade de substâncias, como açúcares, peptídios, alcalóides, íons inorgânicos e lipídios. Essas proteínas possuem de 1 a 2 cópias de um setor integral de membrana e um domínio que se liga ao ATP e é orientado para o lado citossólico. Elas usam o MgATP diretamente como fonte de energia para o transporte de solutos orgânicos através das membranas vegetais. As proteínas de resistência à multidrogas (MDR e MRP), que compõem o grupo dos transportadores ABC, também chamadas de bombas GS-X, ou glutathiona-conjugadas, participam do transporte de ânions anfipáticos endógenos e exógenos e outros compostos do citossol para dentro do vacúolo. Processos que dependem das MRPs de plantas são a destoxicação por herbicidas, pigmentação celular, minoração do dano oxidativo, armazenamento de compostos antimicrobianos e transporte de metais pesados (Rea *et al.*, 1998).

2.3 - Sistema de Transporte nos Vacúolos

O vacúolo é constituído por sistemas de transporte de uma grande variedade de substâncias, como mostra o esquema da Figura 1 (Taiz, 1992).

A condição ácida do vacúolo é mantida por duas bombas de prótons distintas: a H^+ -ATPase e a H^+ -PPase. A entrada de prótons é realizada por essas bombas gerando um gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu H^+$) que tem como componentes a variação de pH (ΔpH) e a do potencial de membrana ($\Delta\psi$), obedecendo à relação : $\Delta\mu H^+ = \Delta pH + \Delta\psi$. 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. As bombas de prótons utilizam o ATP e o PPi como fonte de energia para o transporte de prótons para o vacúolo e são chamadas de transportadores ativos primários. O gradiente gerado pelas bombas de prótons fornece energia para os transportadores ativos secundários de açúcares, ácidos orgânicos e inorgânicos.

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).

2.4 - Bombas Eletrogênicas de Próton

Pedersen & Carafoli (1987) baseados em considerações de estrutura e mecanismo, sugeriram que as ATPases fossem agrupadas em 3 classes principais: P (ATPase de membrana plasmática), V (ATPase vacuolar) e F (ATPases de mitocôndria e cloroplasto).

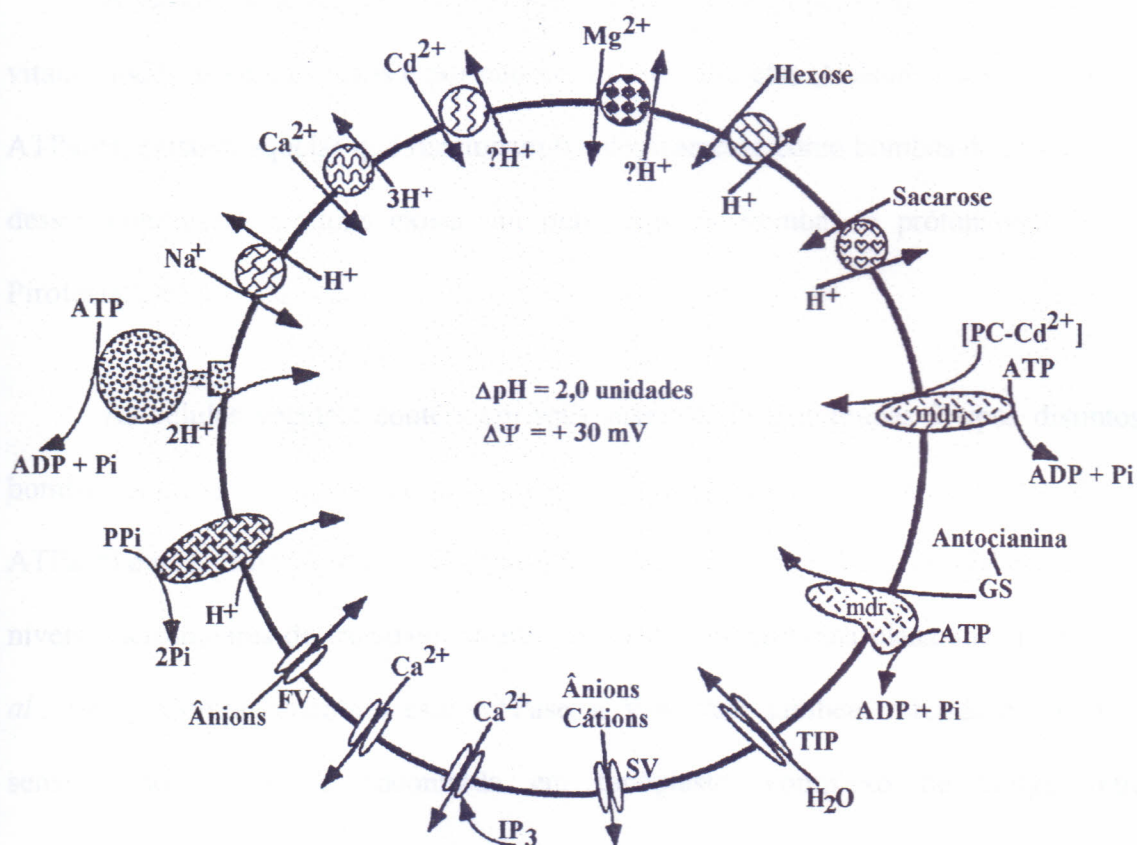


Figura 1. Visão geral do sistema de transporte em tonoplasto (membrana vacuolar) de plantas. Duas bombas de prótons dependentes de ATP e PPI geram o ΔpH e $\Delta\Psi$ necessários para o funcionamento dos transportadores secundários e para o transporte de outros solutos para o interior do vacúolo via contra transportadores (Na^+/H^+ , $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$, $\text{Mg}^{2+}/\text{H}^+$, Hexose/ H^+ e sacarose/ H^+) e canais (canais de ânions FV (“fast vacuolar channel”), canais de Ca^{2+} e canais de Ca^{2+} dependentes de IP_3 (Inositol trifosfato), canais de cátions SV (“slow vacuolar channel”). Estão presentes duas proteínas de resistência à multidrogas, a GS-X ou glutationa conjugada e o transportador do complexo de fitoquelatina com cádmio. O canal de água (TIP – “tonoplast integral protein”) aumenta a condutividade hidráulica para o tonoplasto. Extraída e adaptada de Taiz (1995).

Essas ATPases estão distribuídas em diversas espécies de membranas celulares e suas funções variam de acordo com a sua classificação (Tabela 1).

A importância das prótons-ATPases é inquestionável pelo fato das ATPases serem vitais a todas as células vivas e por não existir vida sem elas (Nelson, 1988). Dentre essas ATPases, existem aquelas que funcionam fisiologicamente como bombas de prótons. Além dessas bombas de prótons existe um outro tipo de bomba de prótons que é a H^+ -Pirofosfatase.

As células vegetais contêm em seus sistemas de membranas 3 tipos distintos de bombas, ATPase do tipo vacuolar (V-ATPase), ATPase do tipo membrana plasmática (P-ATPase) e a H^+ -Pirofosfatase (H^+ -PPase) (Matsuoka *et al.*, 1997). A P-ATPase, sensível a níveis micromolares de vanadato, parece ser restrita à membrana plasmática (Robinson *et al.*, 1994). Contrariamente a essa ATPase, a V-ATPase também referida como ATPase sensível ao nitrato, é encontrada em tonoplasto, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e em membrana plasmática.

Nas membranas vacuolares são encontrados 2 tipos distintos de bombas de prótons: a V- H^+ -ATPase e a V- H^+ -PPase. Essas duas bombas de prótons fornecem o gradiente eletroquímico que é empregado para energizar o transporte de outros solutos (Rea & Sanders, 1987).

2.5 - V- H^+ -ATPase

A primeira evidência da existência de uma V-ATPase em tonoplasto data de 1975, quando D'Auzac caracterizou uma ATPase membranar de *Hevea brasiliensis*. A atividade de hidrólise era máxima em pH 7,5 – 8,0 e era estimulada por Cl^- . Investigações

PROPRIEDADES	V-ATPase	F-ATPase	P-ATPase
Função Fisiológica	Bomba de Próton	Síntese de ATP	Bomba de Próton
Estequiometria			
H ⁺ /ATP	2	3-4	1
pH Ótimo	7,0	8,0 - 9,0	6,5
Estímulo por Íons	Cl ⁻ SO ₄ ⁻²	SO ₄ ⁻²	K ⁺
Inibidores	NO ₃ ⁻ NEM Bafilomicina NBD-Cl DCCD	Azida Oligomicina NBD-Cl DCCD	Vanadato DCCD

Tabela 1: Classificação das ATPases. Perderson e Carafoli (1987).

subsequentes mostraram que o estímulo da V-ATPase por ânions é uma característica comum a todas as ATPases estudadas até o momento (Lüttge & Ratajczak, 1997).

As ATPases do tipo vacuolar foram assim denominadas devido ao fato de terem sido primeiramente caracterizadas em tonoplasto. A denominação permaneceu apesar de terem sido posteriormente encontradas em vários outros sistemas de endomembranas.

A ATPase do tipo vacuolar é encontrada não somente em membranas vacuolares de células de plantas e fungos mas também em endomembranas de células animais e na membrana plasmática de alguns tipos de células animais (Maeshima *et al.*, 1996).

Essas enzimas assemelham-se às F_0F_1 -ATPases (F-ATPases), não formam o complexo intermediário fosforilado e por um longo tempo foram conhecidas por serem insensíveis ao vanadato, distinguindo-se das P-ATPases, que formam um complexo intermediário ligado covalentemente ao fosfato.

Uma relação evolutiva entre a ATPase dos tipos P e F é revelada por homologia seqüencial de algumas das subunidades. Porém, as V-ATPases representam uma classe única de H^+ -ATPases devido terem um pH ótimo neutro em lugar de alcalino e por apresentarem um padrão de inibidores distinto. Elas são insensíveis à azida e mais sensíveis do que as F-ATPases à um reagente sulfidrílico, o N-etilmaleimida (NEM), ao Nitrato e à Bafilomicina A (Barkla & Pantoja, 1996).

2.5.1 - Estrutura e Composição das V- H^+ -ATPases

As V-ATPases são grandes complexos protéicos compostas de 7 a 10 subunidades diferentes, dependendo da espécie. A massa molecular nativa varia de 400 a 650 kDa

(Barkla & Pantoja, 1996). Em analogia com a F-ATPase, foram criadas duas categorias para as subunidades da V-ATPase: setor catalítico hidrofílico e periférico (V_1) e o setor integral, hidrofóbico (V_o). O setor V_1 é composto de 5 a 6 proteínas solúveis. Entre elas encontram-se duas subunidades principais, presentes em 3 cópias cada uma: a subunidade A catalítica de 70 kDa e a subunidade B regulatória de 60 kDa (Barkla & Pantoja 1996). O componente principal do setor V_o é um proteolípido de 16 kDa, a subunidade c, que está presente em 6 cópias. Acredita-se que sua função seja de conduzir os prótons através da membrana.

O setor V_1 , assim como a porção F_1 da F-ATPase, pode ser destacado da membrana através de tratamentos com caotrópicos, com carbonato alcalino, nitrato e MgATP ou choque frio na presença de MgATP. A V-ATPase também pode ser solubilizada como uma holoenzima completa por detergentes não iônicos. Isso permitiu que se determinasse sua massa molecular que varia numa faixa de 560 a 740 kDa entre diversas fontes, como fungos, animais e plantas. O número de subunidades varia entre as espécies (Tabela 2). Por convenção, as subunidades de V_1 são designadas de A-G em uma ordem decrescente de massa molecular. Três diferentes subunidades compõem o setor V_o , duas delas são transmembranares (as glicoproteínas a e c) e uma hidrofílica porém fortemente ligada aos componentes integrais de membrana (Finbow & Harrison, 1997). Nas V-ATPases de plantas superiores podemos encontrar certas diferenças estruturais. Acredita-se que haja mais de um tipo de V-ATPase em plantas. As variações refletem talvez uma regulação da expressão de certas subunidades. Tipos distintos de V-ATPases podem estar associados a diferentes tipos de tecidos, células ou membranas (Ward & Sze, 1992).

FONTE	SUBUNIDADES DA V-H ⁺ -ATPases (kDa)										Ref.	
	A	B					c					
Aveia	70	60	44	42	36	32	29	16	13	12	1	
<i>V.radiata</i>	68	57	44	38	37	32		16	13	12	2	
Cevada	115	68	53	45	42	34	32		17	13	12	3
Beterraba	100	67	55	52	44	42	32	29	16			4
<i>Kalanchoë</i>	72	56	48		42			28	16			5

Tabela 2. Subunidades da V-H⁺-ATPases de plantas superiores. Referências: 1 –Ward & Sze, 1992, 2- Matsuura-Endo *et al*, 1990, 3 – Dupont & Morrissey, 1991, 4- Parry *et al*, 1989, 5 – Bremberger *et al*, 1988). Extraído de Ward & Sze, 1992.

As primeiras investigações sobre a composição de subunidades de V-ATPases de plantas revelaram somente 3 polipeptídios os quais estavam presentes em frações de V-ATPases purificadas como “componentes principais”. Mais tarde descobriu-se que a composição de subunidades em V-ATPases de plantas seria mais complexa e mais de 10 subunidades já foram relatadas. Os “componentes principais” (subunidades A, B e c) têm sido encontrados em todas as ATPases estudadas, sugerindo que essas subunidades seriam essenciais para o seu funcionamento (Figura 2). As demais subunidades apresentadas na literatura foram detectadas somente em certos materiais. As diferenças na composição de subunidades entre as V-ATPases de plantas sugerem que a composição das subunidades pode ser tecido-específica ou regulada pelo meio ou pelo desenvolvimento (Lüttge & Ratajczak, 1997). Essas subunidades estão distribuídas em dois setores (V_1 e V_o), descritas a seguir:

a) Subunidades solúveis de V_1

Subunidade A: a subunidade A de várias fontes de V-ATPase, já foi clonada e sequenciada e mostrou possuir uma variação em sua massa molecular de 67 a 73 kDa. Essa variação na massa molecular deve-se principalmente à diferença encontrada na porção N-terminal. Existe um alto grau de conservação de seqüência dessa subunidade entre as espécies. A homologia existente de 25% entre a subunidade A da V-ATPase e a subunidade β da F-ATPase está concentrada em regiões implicadas na ligação com o nucleotídeo (Finbow & Harrison, 1997).

Subunidade B: a subunidade B da V-ATPase de várias espécies tem sua massa molecular variando entre 55 a 60 kDa. Entre as espécies existe um alto nível de identidade (> 60 %) que contém uma seqüência de consenso para ligação com o nucleotídeo. A

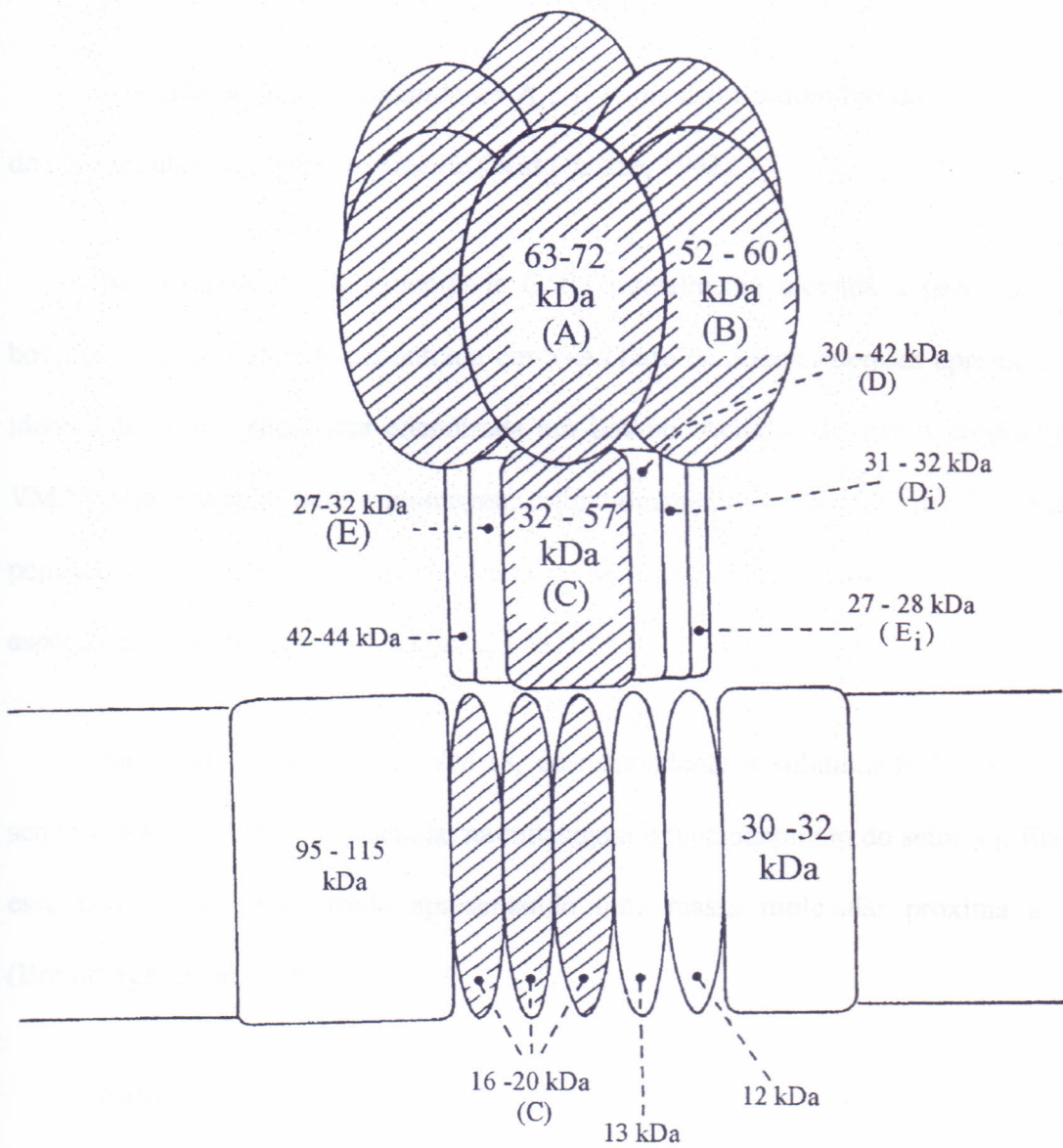


Figura 2. Diagrama das subunidades da V-ATPase encontrada em diferentes materiais vegetais. Extraído de Lüttge & Ratajczak (1997).

subunidade B também mostra 25% de identidade sequencial com ambas subunidades A e α da F-ATPase (Manolson *et al.*, 1988).

Acredita-se que as subunidades A e B contenham o domínio do sítio catalítico e o do sítio regulatório, respectivamente (Ward & Sze, 1992).

Subunidade C: A subunidade C foi inicialmente clonada a partir de DNA de bovinos. A subunidade C encontrada em V-ATPase de *Saccharomyces* apresenta 37% de identidade com a seqüência encontrada em bovino. Acredita-se que o produto do gene VMA5 seja essencial para a montagem e funcionamento do setor V_1 da V-ATPase. Esse peptídeo apresenta massa molecular na faixa de 37 a 52 kDa e já foi encontrado em várias espécies de plantas (Lüttge & Ratjack, 1997).

Subunidade D: o gene VMA8, correspondente à subunidade D, já foi isolado, seqüenciado e mostrou-se essencial na montagem e funcionamento do setor V_1 . Em plantas esse peptídeo foi encontrado apresentando uma massa molecular próxima a 32 kDa (Bremberger *et al.*, 1988).

Subunidade E: a subunidade E é claramente essencial para a montagem da V-ATPase, porém sua função precisa permanece incerta. Essa subunidade E contém uma região rica em lisina semelhante à encontrada em outras ATPases a qual está associada à ligação com cátions citoplasmáticos, sugerindo que a V-ATPase tenha um papel de regulação na acessibilidade do cátion à enzima. Sua massa molecular em plantas varia de 27 a 32 kDa (Lüttge & Ratjack, 1997).

Subunidade F: essa subunidade é um componente integral do setor V_1 . Acredita-se que essa subunidade tenha um papel na estabilização do contato entre V_1 e V_0 . Em levedura, esse peptídeo já foi encontrado com 14 kDa (Finbow & Harrison, 1997).

Subunidade G: acredita-se que essa subunidade esteja associada à porção V_0 da V-ATPase, porém ainda existem resultados controversos. Sua massa molecular em levedura é de 13 kDa (Finbow & Harrison, 1997).

Subunidade codificada pelo gene VMA13: o gene VMA13 de levedura codifica uma proteína hidrofílica de 54,4 kDa que não possui nenhuma semelhança com outras seqüências de subunidades encontradas. Acredita-se que essa subunidade tenha um posicionamento periférico em V_1 e que ela tenha um papel na estabilização dessa enzima. Um polipeptídeo de massa molecular semelhante foi encontrado também em planta (Parry *et al*, 1989).

b) Subunidades de V_0 .

Subunidade c: A estrutura do setor V_0 , em plantas, é ainda pouco compreendida (Sze *et al.*, 1999). A subunidade c que está presente em todas as formas de V_0 , constitui-se de uma subunidade de 16-17 kDa que tem sido amplamente estudada e seu gene, em várias espécies, já foi clonado (Finbow & Harrison, 1997). Essa subunidade é um proteolípido integral de membrana que está presente em seis cópias/enzima (Ward & Sze, 1992). Essa proteína apresenta-se altamente hidrofóbica contendo quatro segmentos hidrofóbicos em sua estrutura. Essa subunidade é uma das proteínas de membrana mais conservadas, apresentando mais de 65% de identidade entre todas as espécies estudadas e forma a passagem principal do transporte de prótons. Sua função está também associada à estabilização da enzima e à montagem de V_1 (Finbow & Harrison, 1997).

Subunidade de 100-116 KDa: Embora inicialmente encontrada somente em certas V-ATPases, essa proteína é hoje aceita como um componente de todas as V-ATPases e já foi clonada em várias espécies. Sua topologia membranar ainda permanece obscura, porém sua sensibilidade à proteólise sugere que sua porção N-terminal esteja exposta citoplasmaticamente (Finbow & Harrison, 1997).

2.5.2. Microscopia Eletrônica

Micrografias eletrônicas de V-ATPases de *M. crystallinum* (Kramer *et al*, 1995) têm mostrado que a porção V_1 não se apresenta sempre como um hexâmero (estequiometria A_3B_3), mas algumas vezes apresenta-se como um pentâmero. Em análise rotacional de imagem observa-se que 26,5% das imagens de V_1 apresentam-se como hexâmero e 29,8% como pentâmero. O restante das imagens mostrou-se difuso, provavelmente devido a um insuficiente contraste de imagem. Acredita-se que a estrutura hexamérica da porção V_1 seja a configuração cataliticamente ativa. A estrutura pentamérica pode ser um produto intermediário relativamente estável da degradação e/ou montagem da holoenzima.

Em condições de estresse salino, a halófito *M. crystallinum* tem a porção V_1 e a haste da V-ATPase aumentadas de tamanho (Figura 3). Isso se explica pela adição de dois peptídeos D e E e pela terminação superior da haste que se projeta entre as subunidades A e B dentro da porção V_1 . Dessa maneira, ocorre mais espaço livre entre alguns dos seus componentes (Lüttge & Ratajczak, 1997). As partículas integrais de membrana (IMPs) também se tornam significativamente aumentadas. Esse fato é acompanhado pelo aumento de mRNA e níveis protéicos da subunidade c que compõem a porção V_0 , levando a crer

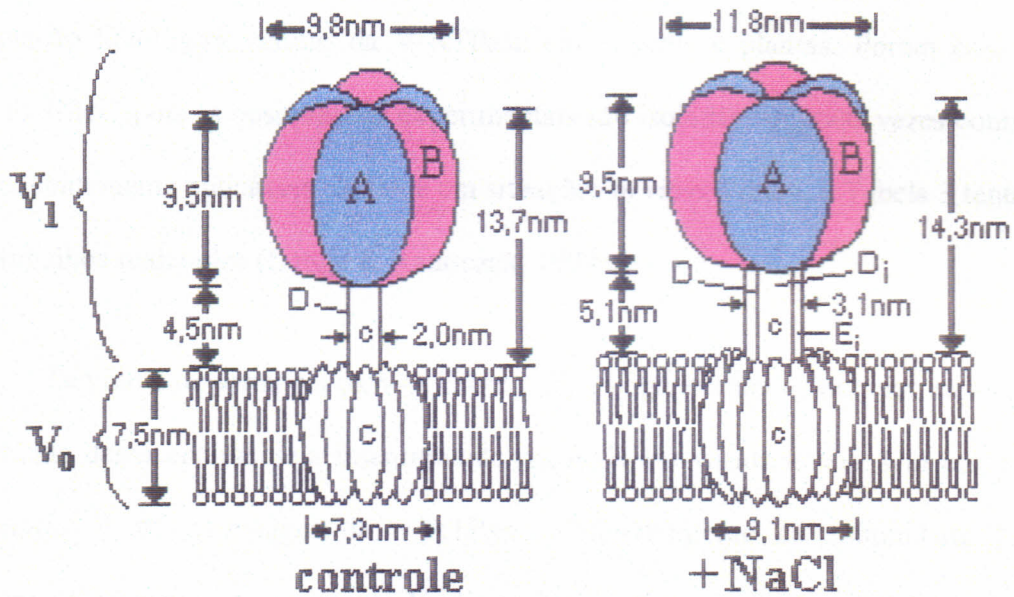


Figura 3. Modelo e dimensões dos domínios V_1 e V_0 da V-ATPase de *Mesembryanthemum crystallinum* em condições controle e de estresse. Extraído de Lüttge & Ratajczak (1997).

que exista um aumento estequiométrico da subunidade c por holoenzima em condições de estresse em relação ao controle (Rockel *et al.*, 1994).

2.5.3. Regulação

Vários estudos têm sido realizados para esclarecer os elementos da rede de regulação fisiológica celular da V-ATPase em animais e plantas. Porém esse estudo é muito difícil, pois as observações experimentais são isoladas, algumas vezes contraditórias e freqüentemente aplicáveis somente em situações *in vitro*. Porém, a Tabela 3 tenta resumir os trabalhos realizados (Lüttge & Ratajczak, 1997).

Devido à importância da V-ATPase na fisiologia celular e vacuolar, espera-se que a atividade dessa enzima seja intensamente regulada em vários níveis. Um outro nível de regulação é na montagem da V-ATPase. Diferentemente da subunidade F_o , que é livremente permeável a prótons, V_o livre de V_1 não permite o transporte de prótons. Igualmente, "pools" de V_1 citoplasmático parecem incapazes de hidrolisar ATP. O desacoplamento dos dois domínios é, portanto, um método eficiente de controle da atividade sem a fútil hidrólise de ATP ou colapso do potencial de membrana (Finbow & Harrison, 1997).

Tem sido observado em espécies de *Kalanchoë* que a V-ATPase de tonoplasto é cineticamente regulada pela V-PPase. Se a V-ATPase é energizada pela adição de MgATP à preparação de vesículas de tonoplasto, poucos minutos após a energização da V-PPase pelo pirofosfato, sua velocidade inicial é fortemente aumentada. Isso não acontece quando ambos os substratos são adicionados simultaneamente ou quando outro nucleotídeo é usado e nenhum efeito é visto quando o pirofosfato é adicionado após o ATP. Entretanto, a natureza da interação entre as duas enzimas não é conhecida (Lüttge & Ratajczak, 1997).

Variáveis/Regulação	Observações Experimentais
Sensibilidade ao pH	pH ótimo da V-ATPase <i>in vitro</i> 8,0 – 8,5 (7,0 – 7,5) Aumento do pH ótimo de 7,4 a 8,0 devido ao estresse salino em vesículas de tonoplasto e não em V-ATPase solúvel de <i>M. crystallinum</i>
Especificidade ao Substrato	ATP >> GTP > NTP
Sensibilidade à Cátions	Pequena ou nenhum efeito
Sensibilidade à Anions	Estímulo pelo Cl ⁻ , inibição por NO ₃ ⁻ e P _i
Regulação por Redox/grupos SH	Grupo SH inibem atividade da V-ATPase Luz azul induz a inibição da V-ATPase por singlet oxigen e H ₂ O ₂ que oxidam os grupos SH essenciais Os grupos SH são essenciais para a subunidade A catalítica e na subunidade B regulatória da V-ATPase
Regulação pelo meio lipídico	Fosfolipídios na fase líquida cristalina são necessários para a atividade
Regulação por fosforilação	Proteínas do tonoplasto são fosforiladas e inibem a V-ATPase
Regulação por fitohormônios	ABA pode ou não inibir a atividade V-ATPásica Citocinina inibe a atividade V-ATPásica
Regulação pela Luz	A luz ao inibir o aumento no tamanho vacuolar regula a subunidade A e o mRNA para a subunidade c

Tabela 3. Respostas Fisiológicas em Células de Plantas Superiores. Extraída e adaptada de Luttge & Ratajczak (1997).

Em células vegetais que acumulam NaCl, a força motriz para o transporte secundário ativo de Na^+ para dentro do vacúolo é fornecida pela força próton motriz (PMF) gerada através do tonoplasto pelas duas bombas de próton, a V-ATPase e a V-PPase. Isso sugere que a V-ATPase pode ter um papel fundamental na energização da atividade do contratransporte Na^+/H^+ em células que acumulam quantidades significativas de NaCl (Barkla & Pantoja, 1996). Vários grupos têm estudado a regulação da atividade V-ATPásica e níveis de expressão das subunidades da enzima durante o crescimento da halófito *M. crystallinum* em NaCl. A medida de ambas as atividades de transporte de H^+ e de hidrólise foram duas vezes maior em vesículas de tonoplasto isoladas de folhas de plantas tratadas com sal (200 mM) quando comparadas com medidas de atividade em plantas-controle na mesma idade (Barkla *et al.*, 1990). Bremberger *et al* (1988) também relataram aumentos na atividade hidrolítica da V-ATPase de folhas de plantas de *M. crystallinum* tratadas com sal, baseadas em comparações com plantas-controle. Com 23 dias de tratamento, o aumento foi maior em plantas tratadas com 400 mM de NaCl e observou-se que o aumento dependia das concentrações do tratamento com NaCl. Evidências têm sido mostradas correlacionando esse aumento na atividade da V-ATPase em *M. crystallinum* tratada com sal com alterações na quantidade das subunidades D, E e c da enzima, bem como um aumento no espaço entre as subunidades. (Lüttge & Ratajczak, 1997).

Estudos sobre a composição da V-ATPase associada à porção V_o revelaram um aumento nas partículas intramembranares associadas ao setor V_o (Rockel *et al.*, 1994). Além disso, os mRNA referentes à subunidade c parecem ser os mais aumentados em resposta à elevação da salinidade (Lüttge & Ratajczak, 1997). A atividade da V-ATPase tem sido estudada em várias espécies após um curto tempo de exposição da raiz ao sal e em linhagens de células adaptadas ao sal. Matsumoto & Chung (1988) mostraram que a

velocidade de transporte de H^+ da V-ATPase de raiz foi duplicada após 3 dias de tratamento com NaCl 200 mM. Os inibidores de síntese de proteína, a cicloheximida e a antimicina D, inibiram o aumento da atividade ATPásica induzido por sal, sugerindo que a exposição da raiz de cevada ao NaCl induz a síntese de subunidades da V-ATPase, assim contribuindo para o aumento da atividade de transporte (Matsumoto & Chung, 1988). Nakamura *et al.* (1992), mediram a atividade de transporte da V-ATPase da raiz de *Vigna radiata* tratada com sal e mostraram um aumento de 1,4 e 1,3 vezes na atividade V-ATPásica após 3 -12h de exposição ao NaCl 100mM, respectivamente. Essa rápida indução levou os autores a sugerir modificações pós-traducionais na V-ATPase em lugar da indução na síntese de proteína, em contraste com os resultados apresentados com raiz de cevada. Aumento na atividade de hidrólise da V-ATPase tem sido observado em células de *Acer pseudoplatanus* adaptadas ao NaCl (Zingarelli *et al.*, 1994). A atividade específica da V-ATPase sensível ao nitrato foi duas vezes maior em membranas microsomais isoladas de células crescidas em sal (80 mM de NaCl) no começo da fase estacionária quando comparada com atividades medidas em linhas de célula não adaptadas no mesmo estágio de crescimento. Em culturas de suspensão de células de tabaco, Reuveni *et al.* (1990) estudaram as atividades de transporte e de hidrólise da V-ATPase de células adaptadas e não adaptadas ao NaCl, crescidas em NaCl 428 mM. Usando anticorpos policlonais contra a subunidade de 70 kDa da V-ATPase de beterraba, eles determinaram que a quantidade de proteína imunodetectada na fração de tonoplasto de células de tabaco adaptadas ao NaCl foi quatro vezes menor do que em células não adaptadas. Conseqüentemente, a capacidade de transporte de H^+ relativa e a atividade de hidrólise de ATP, por unidade de subunidade de 70 KDa, de células adaptadas ao NaCl foi de três a quatro vezes maior do que a obtida em células não adaptadas. A regulação por NaCl nos níveis de mRNA para a subunidade de 70 KDa da V-ATPase foi estudada em células de tabaco por Narasimhan *et al.* (1991).

Eles encontraram que os níveis de mRNA de células não adaptadas e adaptadas crescidas continuamente na presença de NaCl (428mM) não mostraram diferenças significativas. Porém, Reuveni *et al.* (1990) encontraram que a quantidade de polipeptídios de 70 kDa imunodetectados foi quatro vezes menor em células adaptadas. Quando células adaptadas cresceram na ausência de NaCl foram em seguida submetidas ao NaCl por 24 h, os níveis de mRNA do polipeptídio de 70 KDa aumentaram 2,3 vezes acima do nível do controle (Narasimhan *et al.*, 1991). Isso foi atribuído ao melhoramento na capacidade de células adaptadas, quando reexpostas ao sal, em regular os mecanismos necessários para crescer em meio salino (Narasimhan *et al.*, 1991).

Löw & Rausch (1996) estudaram o efeito do NaCl 100 mM sobre cultura de células de cenoura e observaram que após quatro dias de tratamento com sal, a atividade de transporte de prótons pela ATPase aumentou em 60% enquanto que a atividade de hidrólise diminuiu em 20%. As mudanças nas atividades mostraram uma aparente duplicação na relação de acoplamento do transporte de H^+ com a hidrólise de ATP. A análise do western blot não revelou alterações significativas pelo sal na quantidade das subunidades A, B, D, E e c. Os resultados indicam que em células de cenoura tratadas com sal, propriedades intrínsecas da V-ATPase foram afetadas por um mecanismo ainda não identificado e que pode ser explicado de diferentes maneiras: a) uma modificação na composição lipídica do tonoplasto em condições salinas poderia afetar a estrutura e a função do complexo V_o e assim, indiretamente, estimular o transporte de H^+ ; b) o número de sítios de ligação para o transporte de H^+ poderia ser modificado pós-traducionalmente em uma ou mais subunidades da V-ATPase em condição salina comparada ao controle e ainda c) a relação de acoplamento pode ter sido modificada por alterações na bomba, ocorridas nas pontes de dissulfeto intramoleculares. Tal mecanismo sugere que em condições salinas, as bombas estariam mais fortemente acopladas através de um rearranjo

das suas pontes dissulfeto e que, o transporte de H^+ seria mais sensível ao estado redox do que seria a hidrólise de ATP.

2.5.4. Ação de Inibidores

Determinadas moléculas são capazes de interagir com a V-ATPase e causar uma inibição nas atividades de hidrólise e transporte de H^+ . Algumas dessas substâncias são específicas para a V-ATPase e em muitos casos fornecem informações não somente sobre o mecanismo catalítico da enzima como também sobre a arquitetura e disposição das subunidades individuais (Finbow & Harrison, 1997).

A atividade da V-ATPase pode ser distinguida da atividade de outras bombas que hidrolisam ATP pela sua sensibilidade a diferentes inibidores (Tabela 1). A V-ATPase foi considerada por um longo tempo insensível ao vanadato diferentemente da P-ATPase, na qual o vanadato impede a formação do complexo intermediário fosforilado, necessário ao ciclo funcional. A V-ATPase é sensível ao nitrato (o qual inibe também a atividade da F-ATPase), porém é insensível à azida e à oligomicina, uma propriedade que é útil para distinguir entre as atividades da F- e da V-ATPase (Finbow & Harrison, 1997).

Mais recentemente, foi descoberto que, algumas das V-ATPases são de fato sensíveis ao vanadato em certo grau e que as H^+ -ATPases de tonoplasto de células de *Acer pseudoplatanus* formava um intermediário fosforilado que operava com o mecanismo catalítico encontrado na ATPase do tipo P (Magnin *et al.*, 1995). Um outro exemplo é a ATPase de tonoplasto de frutos de *Citrus limon*, que se mostrou sensível ao vanadato (Müller *et al.*, 1996). Portanto, é importante ter um inibidor específico para a V-ATPase, *i.e.* a Bafilomicina A_1 , um antibiótico descrito por Bowman *et al* (1988). A V-ATPase também é inibida por uma variedade de agentes modificadores de proteína que se ligam

covalentemente aos resíduos de aminoácidos de diferentes subunidades da V-ATPase. O uso desses agentes tornou possível revelar informações sobre a função de diferentes subunidades, baseado no seu domínio de ação descrito a seguir:

a) Inibidores do domínio solúvel

A ação inibitória do NBD-Cl é baseado na sua analogia estrutural com o ATP. Esse composto modifica covalentemente a subunidade A de V_1 , resultando numa diminuição da atividade de hidrólise de ATP (Finbow & Harrison, 1997). A presença de resíduos de cisteína próximos ao sítio ativo de V_1 é um fator crucial na sensibilidade das V-ATPases ao inibidor, que promove a inibição da hidrólise de ATP com baixas concentrações, da ordem do micromolar. A presença de resíduos de cisteína perto do sítio ativo de V_1 é um fator crucial para a sensibilidade da V-ATPase ao inibidor NEM. A ligação de NEM ou NBD-Cl à subunidade A inativa a V-ATPase, indicando que a subunidade A é a subunidade catalítica da V-ATPase (Lüttge & Ratajczak, 1997).

A inibição da V-ATPase pelo nitrato tem sido amplamente documentada em vários sistemas e parece ocorrer como um somatório de dois fenômenos distintos. Em alta concentração, o nitrato parece agir como um agente caotrópico, com a inibição ocorrendo devido à dissociação das subunidades periféricas de V_1 . Um outro efeito deve-se à ação oxidante do nitrato, que resulta na promoção da formação de ligações cruzadas de dissulfeto entre os resíduos de cisteína em V_1 , que posteriormente tornam-se inativados e liberados da membrana. Nessa mesma linha de raciocínio acredita-se que o efeito redox no citoplasma *in vivo* regula a atividade da V-ATPase formando ligações dissulfeto (Finbow & Harrison, 1997).

A ligação de um análogo do ATP [α - ^{32}P]3-*o*-(4-benzoil)benzoiladenosina 5'-trifosfato com a subunidade B, indica que essa subunidade também contém o sítio de ligação com o nucleotídeo.

b) Inibidores que agem nos sítios de membrana

A sensibilidade das V-ATPases ao N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCCD) tem sido amplamente documentada e foi mostrado que o efeito desse inibidor era exercido através de modificações covalentes do proteolípido de 16 kDa. Concentrações micromolares de DCCD são suficientes para inibir completa e irreversivelmente o bombeamento de prótons, porém somente 60-80% da atividade de hidrólise é perdida.

A bafilomicina A₁ inibe a atividade da V-ATPase de várias fontes numa concentração de 10⁻⁹ M. Esse antibiótico inibe a P-ATPase, porém numa concentração bem mais alta (10⁻⁶ M), enquanto que a F-ATPase é completamente insensível ao seu efeito. O mecanismo de inibição da bafilomicina A₁ na V-ATPase de planta é ainda desconhecido. No entanto, sabe-se que a bafilomicina é fortemente lipofílica e é capaz de entrar na célula. Acredita-se que sua inibição seja do tipo não competitiva, que ela liga-se à ATPase num sítio diferente do sítio catalítico, provavelmente na subunidade de 16 kDa (White, 1994). Recentemente, foi identificado um outro antibiótico, a concanamicina, que seria um inibidor mais efetivo do que a bafilomicina A₁. A inibição total da atividade da V-ATPase pela concanamicina é obtida com concentrações de aproximadamente 10⁻¹⁰ M (Dröse *et al.*, 1993).

2.5.5. Isoformas

A existência de isoformas para as subunidades da V-ATPase é sugerida com base em diferentes linhas de evidência. A primeira é a variação na composição das subunidades em diferentes espécies. A segunda é a presença de famílias multigênicas para diferentes subunidades. As plantas têm mostrado ter isoformas para várias das diferentes subunidades da V-ATPase. Observou-se em aveia, a presença de uma família de, pelo menos, quatro genes que codificam a subunidade de 16 kDa (Lai *et al.*, 1991). Foram encontradas isoformas das subunidades A e B em várias espécies. A presença de famílias multigênicas sugere que alguns genes para a V-ATPase funcionem como genes de manutenção (genes tipo "housekeeping"), outros estão sob mecanismo específico de controle do tecido ou da célula ou podem responder a variações no desenvolvimento ou variações no ambiente, o que permite a cada subunidade ser amplificada ou suprimida quando for requerido (Barkla & Pantoja, 1996).

2.5.6. Evolução da H⁺-ATPase Vacuolar

Estudos recentes têm dado atenção à relação evolutiva entre as H⁺-ATPases, em particular as F₀F₁-ATPase (Tipo F) e a H⁺-ATPase (Tipo V). As ATPases do Tipo V e F apresentam semelhanças estruturais e funcionais (Nelson, 1988; Pedersen & Carafoli, 1987; Forgac, 1989). Ambas apresentam-se como grandes complexos oligoméricos de aproximadamente 500 kDa, compostos por um setor catalítico solúvel em água e um setor integral de membrana que é formado por um complexo que constitui o canal de prótons. Cada setor hidrofílico contém 3 cópias da subunidade catalítica, subunidade β para a F-ATPase e subunidade A de 70 kDa para a V-ATPase, 3 cópias para a subunidade regulatória, subunidade α para a F-ATPase e subunidade B de 60 kDa para a V-ATPase e

uma cópia de cada para as subunidades secundárias. As comparações das sequências das subunidades A e B com as subunidades β e α confirmam que as V-ATPases e as F-ATPases são geneticamente relacionadas porém são grupos independentes de bombas de prótons (Lüttge & Ratajczak, 1997). As subunidades A e β , respectivamente, são altamente conservadas, com aproximadamente 60% de identidade em diferentes organismos. Porém, a baixa semelhança geral de 25% e a presença de uma longa faixa de sequência não homóloga na subunidade de 70 kDa, sugerem que elas divergem no início da evolução (Gogarten *et al.*, 1989). Entretanto, são encontradas regiões altamente conservadas que incluem o sítio catalítico (Zimniak *et al.*, 1988). Além disso, a homologia das subunidades A e B e β e α , respectivamente, indica que elas apareceram a partir da duplicação de um gene que ocorreu antes do último ancestral comum de eubactéria, eucariotos e sulfolobus. Portanto, a árvore filogenética contém 3 ramos principais: o da eubactéria, o do eocítico e o da célula receptora eucariótica. A ocorrência da duplicação de um gene originou as subunidades catalítica e não catalítica antes da divergência em arqueobactéria, eucariontes e eubactérias, como mostra o esquema sugerido por Gogarten *et al.* (1989) (Figura 4).

Somente poucas sequências completas de subunidades da V-ATPase são conhecidas. A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) recentemente tornou-se um instrumento importante para deduzir relações evolutivas a partir de comparações de sequências da V-ATPase. Diferentes tipos de V-ATPase que consistem de distintas isoformas podem estar localizados em diversos sistemas de membranas celulares. Isoformas diferentes podem ser expressas durante o desenvolvimento de plantas e em resposta a certas condições ambientais (Lüttge & Ratajczak, 1997). Resultados recentes têm mostrado a expressão diferencial de subunidades da V-ATPase em diferentes tecidos (Hasenfratz *et al.*, 1995; Löw *et al.*, 1996) o que pode envolver a expressão diferencial de isoformas.

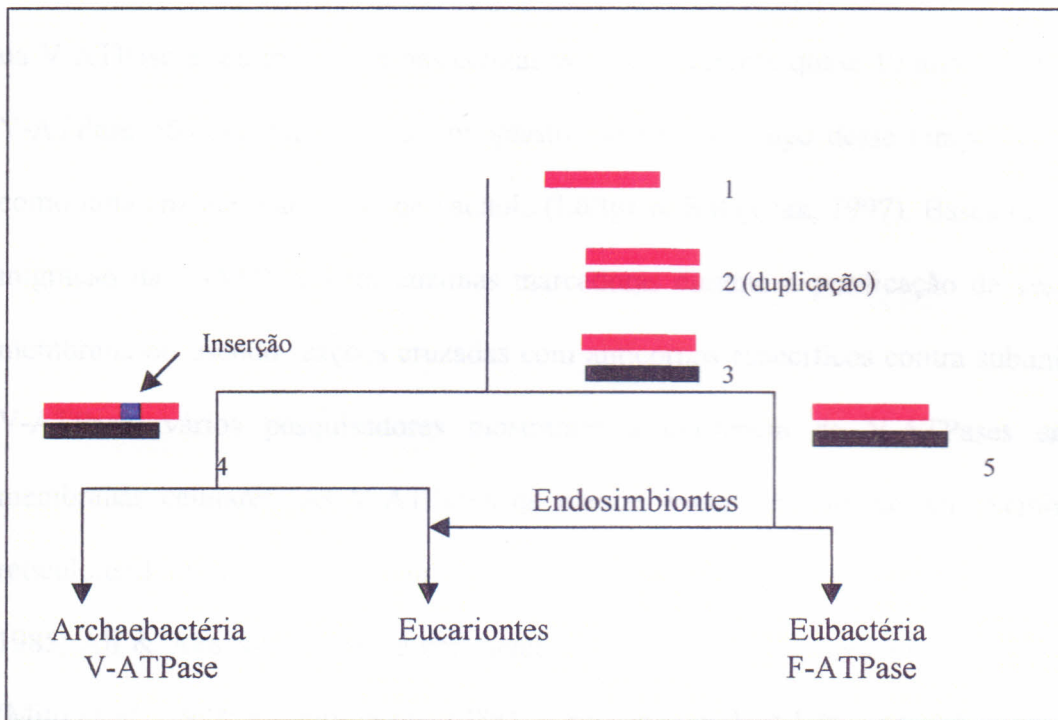


Figura 4. Relação filogenética entre archaeobactérias, eubactérias e eucariontes e organelas endosimbiontes (mitocôndrias e clorosplastos) derivadas a partir de comparações de subunidades das H^+ -ATPases. 1. O complexo catalítico consiste de um único peptídeo codificado por um único gene (■ - apresenta atividade catalítica); 2. ocorre duplicação do gene, formando duas diferentes subunidades, ambas catalíticas; 3. Uma das subunidades perde sua atividade catalítica e torna-se regulatória (■ - complexo regulatório); 4. O gene catalítico ganha uma região próxima a região amino-terminal, provavelmente por inserção (esta região não apresenta homologia com outras subunidades); 5. A subunidade não catalítica aumenta de tamanho em relação a subunidade catalítica. Extraída de Gogarten, 1989.

2.5.7. Ontogenia das V-ATPases

Até o momento, poucas informações têm sido fornecidas a respeito da montagem da V-ATPase e seu transporte nas células vegetais. Durante quase 10 anos soube-se que a V-ATPase não era exclusiva de tonoplasto, porém, ao longo desse tempo ela foi usada como uma enzima marcadora de vacúolo (Lüttge & Ratajczak, 1997). Baseando-se na comigração da V-ATPase com enzimas marcadoras durante a purificação de vesículas de membrana ou usando reações cruzadas com anticorpos específicos contra subunidades da V-ATPase, vários pesquisadores mostraram a existência de V-ATPases em outras membranas celulares. As V-ATPases de plantas foram encontradas em membranas do retículo endoplasmático (Churchill *et al.*, 1983), em complexo de Golgi (Chanson & Taiz, 1985; Ali & Akazawa, 1986) e em membrana plasmática de hipocótilo de *Vigna radiata* (Mito *et al.*, 1988; Kimura *et al.*, 1988). A presença da V-ATPase em diferentes sistemas de membranas é explicada pelo fato do vacúolo fazer parte integral do sistema de endomembranas que inclui o retículo endoplasmático, complexo de Golgi, vesículas secretórias, membrana plasmática, o envólucro nuclear e vesículas transitórias (Harris, 1986). Entretanto, a função da V-ATPase nas diferentes membranas ainda não está esclarecida, bem como onde esse complexo é sintetizado e montado. O mais recente modelo que explica a montagem da V-ATPase é baseado no trabalho com mutantes de leveduras deficientes em uma subunidade da V-ATPase. Esse trabalho sugere que os complexos V_o e V_1 são sintetizados independentemente. Acredita-se que a porção V_o seja sintetizada no retículo endoplasmático, enquanto existem evidências de que a porção V_1 seja sintetizada no citoplasma. Ainda não foi esclarecido em qual compartimento celular os complexos V_o e V_1 de levedura são acoplados para formar a V-ATPase funcional. Trabalhos recentes têm indicado um mecanismo diferente de montagem da V-ATPase em plantas. Usando anticorpos monoclonais contra subunidades periféricas da V-ATPase,

Herman *et al.* (1994) encontraram subunidades de V_1 além de subunidades de V_0 em retículo endoplasmático, vesículas de membranas derivadas de Golgi e em provacuólos de células da ponta de raiz de *Avena sativa*. Aplicando diferentes técnicas de purificação de vesícula de membrana, Oberbeck *et al.* (1994) encontraram V-ATPase composta dos complexos V_0 e V_1 em frações purificadas, derivadas do retículo endoplasmático e complexo de Golgi de células de raiz de milho (*Zea mays*). Esses resultados apoiam o modelo no qual a V-ATPase é completamente montada no retículo endoplasmático, tornando-se parte do vacúolo diretamente a partir do retículo endoplasmático ou distribuída via complexo de Golgi para o sistema de endomembranas (Figura 5). Entretanto, ainda são necessários estudos sobre a montagem da V-ATPase para que se tenha um modelo conclusivo (Lüttge & Ratajczak, 1997).

Uma questão ainda a ser respondida é se as V-ATPases encontradas em membranas não vacuolares possuem atividade de hidrólise de ATP e transporte de prótons. Em alguns casos foram encontradas V-ATPases em retículo endoplasmático e complexo de Golgi onde não apresentaram atividade de hidrólise nem de transporte de prótons. Acerca dessa questão impõe-se a pergunta se essa enzima seria modificada pós-traducionalmente ou se seriam isoformas. De qualquer modo, já foram detectadas diferenças nas V-ATPases encontradas em retículo endoplasmático e em Golgi em relação às encontradas em tonoplasto. Essas diferenças foram identificadas com relação à sensibilidade a inibidores. Por exemplo, a ATPase encontrada no complexo de Golgi parece ser menos sensível à inibição pelo nitrato do que a V-ATPase de tonoplasto (Chanson & Taiz, 1985; Ali & Akazawa, 1986) e a V-ATPase encontrada no retículo endoplasmático apresentou distinto padrão de inibição ao da V-ATPase de tonoplasto (Vincente & Vale, 1994).

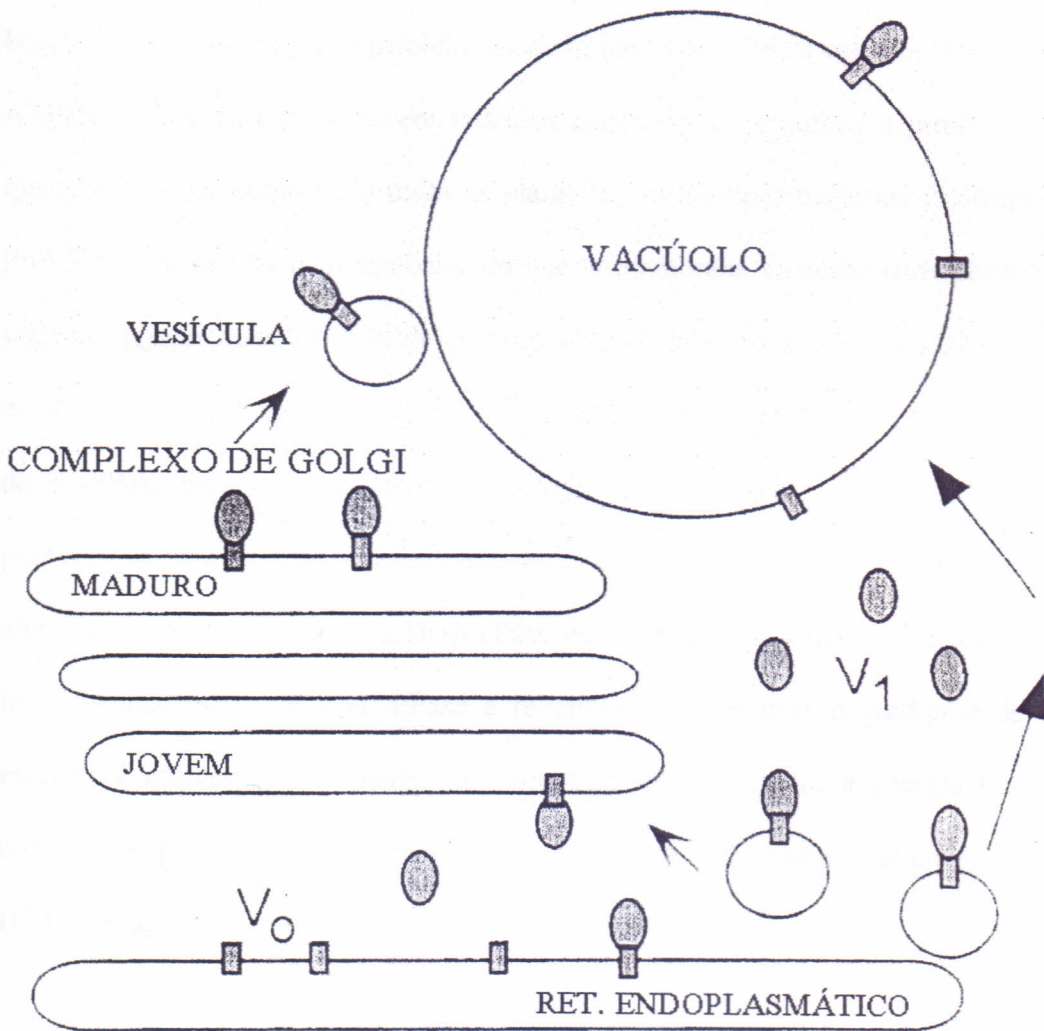


Figura 5. Modelo para a síntese, distribuição e atividade da V-ATPase em plantas em diferentes compartimentos celulares e suposto tráfego das V-ATPases via indicação das setas dentro da célula. Extraído de Sze *et al.*, 1999.

2.6. V-H⁺-PPase

Uma característica própria de plantas é a existência de vias metabólicas paralelas que usam tanto nucleotídeos quanto pirofosfato como fontes alternativas de energia. Essa maior versatilidade das plantas em relação aos mamíferos deve-se à presença de duas bombas que funcionam em paralelo em membranas de células vegetais. Uma delas é a H⁺-ATPase, a qual está presente em todos os eucariontes e a outra é a pirofosfatase (PPase) que tem sido encontrada em todas as plantas e em algumas bactérias fototrópicas (Rea & Poole, 1993). Já está bem estabelecido que, a membrana vacuolar (tonoplasto) de células vegetais possui duas bombas de prótons, a H⁺-ATPase e a H⁺-PPase. As razões para a existência de duas bombas é ainda obscura (Rea & Sanders, 1987) e, em particular, o papel da H⁺-PPase precisa ser elucidado (Leigh *et al.*, 1992). São sugeridas diversas hipóteses para a existência de duas bombas numa mesma membrana: a) a H⁺-PPase agiria como uma alternativa ("back-up") para a H⁺-ATPase em condições em que o fornecimento de ATP fosse limitado; b) que a H⁺-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 H⁺-PPase agir como bomba *in vivo* (Leigh *et al.*, 1992).

2.6.1. Caracterização Inicial

A PPase foi primeiramente identificada em vacúolo, e daí então ela foi considerada uma enzima marcadora de vacúolo (Chanson *et al.*, 1985; Rea & Poole, 1985). A localização da H⁺-PPase é ainda controversa. Inicialmente, como ela foi isolada no tonoplasto, acreditava-se que ela fosse uma enzima marcadora de vacúolo, porém estudos recentes têm mostrado que a H⁺-PPase é encontrada em membrana plasmática, complexo

de Golgi e retículo endoplasmático. Sua função ainda não é bem conhecida, porém qualquer que seja sua função, sua presença não se resume ao tonoplasto (Robinson, 1996).

Em meados dos anos 70, Karlsson (1975) demonstrou uma atividade PPásica estimulada por K^+ e Walker & Leigh (1981) caracterizaram uma PPase dependente de Mg^{2+} . Somente em 1985 é que finalmente identificaram que o transporte de H^+ dependente de PPi era mediado por uma PPase e não uma V-ATPase, capaz de usar PPi em algumas circunstâncias. Seguidas caracterizações mostraram que, essa PPase diferia da V-ATPase em vários aspectos: a PPase era estimulada pelo K^+ enquanto que a V-ATPase era seletivamente ativada por halógenos; nem a hidrólise nem o transporte de prótons pela PPase eram inibidos por nitrato; finalmente foi mostrado que a PPase era específica para $MgPPi$ (ou Mg_2PPi) como substrato enquanto que a V-ATPase não mostrava nenhuma atividade em relação a esse composto.

2.6.2. Atividade e distribuição

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 (plantas monocotiledôneas, dicotiledôneas, C3, C4 e CAM) como também em seus prováveis ancestrais, as algas clorófitas. Além disso, a V-PPase é o componente principal das membranas vacuolares capaz de gerar um $\Delta\mu_{H^+}$ de magnitude igual ou superior ao da V-ATPase (Maeshima e Yoshida, 1989). A estimativa do teor das enzimas sugere que as mesmas constituem de 1% (*Beta vulgaris*) a 5-10% (*Vigna radiata*) da proteína total da membrana vacuolar (Maeshima & Yoshida, 1989).

As membranas vacuolares preparadas de várias espécies de plantas, de musgos, de samambaias e de algas, apresentam atividades H^+ -PPásicas além de atividade V-ATPásica (Nakanishi & Maeshima, 1998). Notáveis exemplos de PPases transportadoras ou conservadoras de energia são as PPases reversíveis transportadoras de prótons encontradas em cromatóforos de bactérias não sulfurosas, *Rhodospirillum rubrum*, as PPases transportadoras de prótons vacuolares de células vegetais e a PPase associada à membrana animal e de mitocôndria de levedura. Essa última, porém, apresenta padrões de sensibilidade a inibidores bem diferente das duas primeiras (Baykov *et al.*, 1993). Baseado nesses resultados, considera-se que as PPases associadas à mitocôndria pertençam a um grupo distinto de PPases (Baykov *et al.*, 1993).

A H^+ -PPase está amplamente distribuída entre as plantas superiores, algas e a bactéria fotossintética, *Rhodospirillum rubrum*. Embora Lichko & Okorokov (1991) tenham demonstrado uma atividade de transporte de prótons dependente de PPi em frações enriquecidas de tonoplasto de *Saccharomyces carlsbergensis*, a H^+ -PPase é ainda considerada restrita a plantas e seus descendentes (Rea *et al.*, 1992).

2.6.3. PPi como fonte de Energia

O teor e a ubiquidade da V-PPase em plantas necessitam um fornecimento regular de PPi citossólico e uma relação de massa de PPi:Pi favorável à translocação de prótons. O nível de PPi em tecidos vegetais varia na faixa de 5-39 nmol/g de peso fresco (Smyth & Black, 1984) e esse PPi parece estar quase que limitado ao citossol. Já foi calculado que em folhas de espinafre e protoplasto de mesófilo de trigo, o PPi citossólico é de 200 a 300 μ M (Weiner *et al.*, 1987), enquanto que, em outras organelas como vacúolo e cloroplasto da alga, *Chara*, foram detectados menos que 1 e de 2 a 3 μ M respectivamente, contra 193 μ M

para o citossol (Takeshige & Tazawa, 1989). Considerando uma estequiometria de H^+ : PPi igual a 1, considera-se que a energia livre liberada pela hidrólise do PPi citossólico excede o mínimo teórico requerido para energização vacuolar.

2.6.4 - Estrutura

A PPase consiste de um único peptídeo com uma massa molecular de aproximadamente 73 kDa, embora tenham sido encontrados valores de massas moleculares diferentes em várias espécies, 67 kDa (*Beta vulgaris*) e 73 kDa (*Vigna radiata*) para a mesma subunidade. Essa subunidade mostra-se não só necessária como suficiente para o transporte de H^+ dependente de PPi. A subunidade que se liga ao substrato funciona como um monômero durante a hidrólise de PPi (Rea & Poole, 1993), embora tenha sido proposto uma estrutura dimérica para a H^+ -PPase funcional nativa (Sato *et al.*, 1991). A estrutura primária da H^+ -PPase foi deduzida a partir do cDNA de *Arabidopsis thaliana*, de cevada, de beterraba, de tabaco e de arroz. No entanto, poucos resíduos característicos foram determinados (Takasu *et al.*, 1997). Kim *et al.* (1995) relataram que, o reagente sulfidrílico, N-etilmaleimida, liga-se covalentemente à Cys⁶³⁴ da PPase de *Arabidopsis thaliana* e portanto inibe a enzima. Esse resíduo é orientado citossolicamente e é inibido pelo N-etilmaleimida, pelo substrato e Mg^{2+} livre. O DCCD também se liga covalentemente à H^+ -PPase e portanto inibe a translocação de prótons. A H^+ -PPase compartilha uma seqüência de consenso com a subunidade que se liga ao DCCD da F_0F_1 ATPase e da $V-H^+$ -ATPase. Portanto, especula-se que o DCCD reage com o resíduo de glutamato na seqüência de consenso da H^+ -PPase de cevada (Nakanishi & Maeshima, 1998).

Takasu *et al.* (1997) propuseram um modelo esquemático para a H^+ -PPase (Figura 6) onde o sítio catalítico ficasse localizado na alça *e* de carga negativa, a qual é adequada para uma ligação com seu substrato Mg_2PPi e que as alças *e* e *k* talvez compusessem a estrutura terciária do sítio catalítico. A porção C-terminal apresentou 90% de homologia com várias PPases, homologia superior à da porção N-terminal. Isso leva a crer que a porção C-terminal seja mais importante para sua função do que a porção N-terminal.

2.6.5. Função Catalítica

A PPase vacuolar *in vitro* requer ambos, Mg^{2+} e K^+ , como também o PPi para uma atividade completa. Porém, a resposta da enzima às mudanças tanto na concentração de PPi total quanto na de Mg^{2+} total pode ser complexa. O PPi é capaz de formar vários complexos íon-metal em meio aquoso (Rea & Poole, 1993). Num meio de reação contendo PPi, Mg^{2+} e K^+ , os complexos e íons presentes incluem Mg^{2+} livre, PPi livre, $MgPPi$, Mg_2PPi , K^+ , e $KPPi$, como também várias formas protonadas dos complexos. Isso torna muito difícil testar um complexo individual numa atividade da H^+ -PPase uma vez que a concentração de qualquer complexo não é facilmente mudada sem que seja alterada a concentração dos demais. Todavia, trabalhos anteriores sugerem que a enzima seja ativada por ambos os íons Mg^{2+} e K^+ e que o substrato seja o $MgPPi$. Além disso, ambos o PPi e o Mg_2PPi poderiam inibir a enzima, embora isso dependesse do tecido de origem (Rea e Poole, 1993). Leigh *et al.*, (1992) sugerem um modelo em que o substrato da enzima seja o Mg_2PPi , que este complexo seja também um inibidor não competitivo, que a enzima seja ativada por Mg^{2+} livre e que seja inibida competitivamente por PPi livre.

Tem sido sugerido que a PPase além da hidrólise de PPi e do transporte de H^+ para dentro do vacúolo tem uma outra função, a de transportar íons K^+ para dentro do vacúolo.

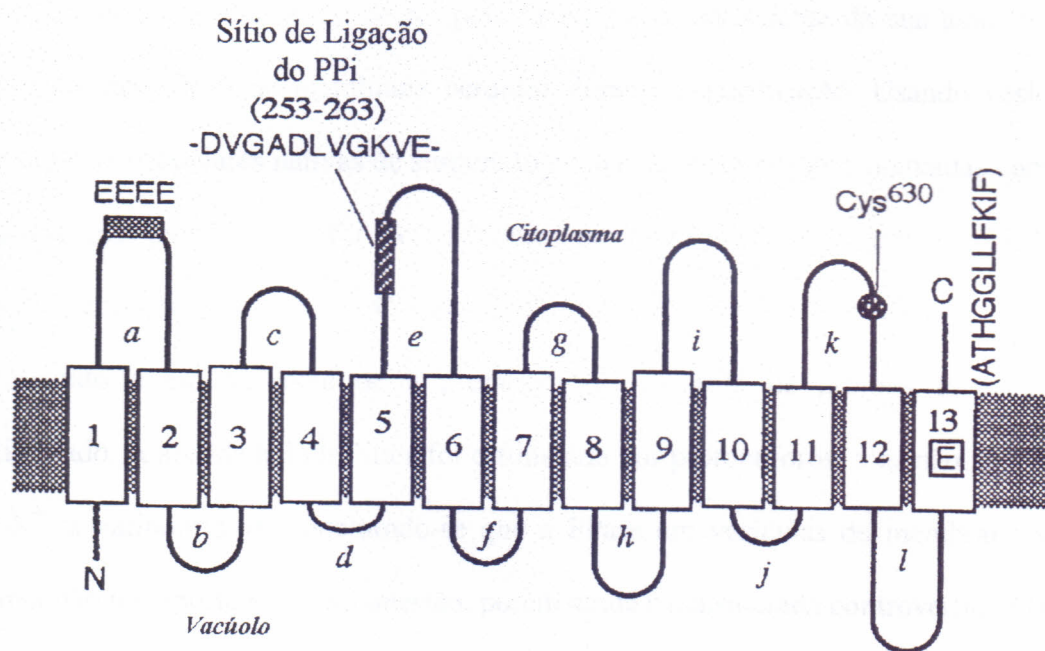


Figura 6. Modelo hipotético da topologia de membrana da H^+ -PPase vacuolar. Extraído de Takasu *et al.* (1997).

O potássio é acumulado no vacúolo contra um potencial de membrana positivo interiormente. O mecanismo que facilita a entrada de K^+ é ainda obscuro (Davis *et al.*, 1992). Porém, a atividade eletrogênica da H^+ -PPase na membrana vacuolar depende do K^+ citoplasmático, levantando a possibilidade de que a enzima transporte K^+ para dentro do vacúolo. (Davis *et al.*, 1992). Desde que esse fato não foi confirmado usando PPase purificada e reconstituída como um polipeptídeo de 75 kDa, Ros *et al.*, em 1995, propuseram que o transporte de K^+ pela PPase fosse dependente da sua associação com outros componentes de membrana perdidos durante a purificação. Usando vesículas de membranas vacuolares nativas de suspensão celular de *Vitis vinifera*, marcadas com sondas fluorescentes para K^+ e H^+ , foi mostrado que a atividade PPásica era fortemente estimulada por desacopladores e por K^+ . O transporte de prótons ocorreu em resposta à adição do pirofosfato e em ausência de K^+ , embora o transporte de prótons fosse altamente estimulado. A atividade hidrolítica foi estimulada por protonóforos, mas não pelo ionóforo de K^+ , a valinomicina, concluindo-se que a PPase em vesículas de membrana vacuolar nativa não transporta K^+ . Essa questão, porém ainda é considerada controversa (Takasu *et al.*, 1997). Obermeyer *et al.*, em 1996, estudaram a dependência da PPase pelo K^+ substituindo o K^+ citoplasmático por outros cátions. A seletividade foi mostrada na seguinte seqüência: $K^+ \geq Rb^+ > NH_4 = Cs^+ > Na^+ > Li^+ =$ colina. Esse trabalho sugere um efeito tipo canalização ("tunneling") através do domínio de um canal na PPase. Sob esse efeito, em determinadas condições de gradiente eletroquímico e na presença de PPI, os íons K^+ atravessam a barreira energética que normalmente separa o citoplasma da face vacuolar da bomba.

2.6.6. Origem

Um grande impulso foi dado para o conhecimento da estrutura e da origem da V-PPase através do isolamento e sequenciamento do cDNA que codifica a subunidade que se liga ao substrato da enzima de *Arabidopsis thaliana* (Sarafian *et al.*, 1992). Baseado na sua seqüência, na composição de suas subunidades, na especificidade ao substrato, e na sensibilidade a inibidores, considera-se a V-PPase como pertencente a uma nova categoria de transportadores primários de íons (Rea *et al.*, 1992). Nenhuma das subunidades das ATPase F, P ou V possui reação imunológica cruzada com a subunidade que se liga ao substrato da V-PPase (Rea & Poole, 1993). Uma ligação filogenética próxima entre a V-PPase e as PPase solúveis é pouco provável. Todas as PPases solúveis possuem subunidades diferentes da V-PPase: ou 20 kDa para enzimas de procariontes ou 32 kDa para enzimas de eucariotos, e nenhuma seqüência conhecida para as PPases solúveis combina com a seqüência deduzida para a V-PPase. Os dados disponíveis sugerem uma origem monofilogenética, embora distante, para a H⁺-PPase de mitocôndria (PM 32.000) e as PPase solúveis. A V-PPase tem sua origem em outra linha de descendência a qual pode ser compartilhada com a da H⁺-PPase reversível (H⁺-PP sintetase) das bactérias fototróficas (*Rhodospirillum rubrum*) de PM de 56.000. Essa última possui reação imunológica cruzada com a subunidade que se liga ao substrato da V-PPase e é capaz de intermediar ambas, a hidrólise de PPi e a translocação de H⁺ (Rea *et al.*, 1992).

A origem evolutiva comum para a V-PPase e para a H⁺-PP sintetase de bactéria pode explicar a distribuição da enzima vacuolar. Todas as bactérias onde as H⁺-PPase sintetases foram detectadas (*Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter spheroides*, *Rhodospirillum rubrum*) são membros de uma sub-divisão da bactéria púrpura. A partir da análise sequencial dos rRNA com 18S e 5S de mitocôndria de planta, vestígio do ancestral

de mitocôndria de planta para o mesmo grupo de eubactéria, foi sugerido que a V-PPase tenha sido introduzida no genoma de planta através da mitocôndria vegetal.. Segundo essa hipótese, a ausência aparente da PPase do tipo vacuolar em animais e fungos torna-se mais compreensível. Portanto, mitocôndrias de animais e fungos devem sua origem à endossimbiose, a um progenitor eubacteriano que não possuía genes para V-PPases (Gray, 1988).

2.7. Estresse nas Plantas

O conceito de estresse em plantas vem sendo desenvolvido nos últimos 60 anos (Lichtenthaler, 1996). Tem sido considerado estresse qualquer condição desfavorável ou efeito induzido por substâncias que afetem ou bloqueiem o metabolismo, o crescimento ou desenvolvimento da planta (Lichtenthaler, 1997).

As plantas respondem ao estresse ambiental de maneira complexa e dinâmica. Um número crescente de evidências mostra que as membranas possuem um papel central na percepção do estresse, respondendo ao estímulo ambiental através da alteração do bombeamento de íons e da conformação das proteínas ligadas à membrana e suas atividades. As membranas participam direta ou indiretamente, determinando a compartimentalização de precursores, intermediários, produtos, e efetores de sistemas enzimáticos não ligados à membrana, influenciando o pH (Amzallag & Lerner, 1995)

Amzallag & Lerner (1995) dividem a resposta ao estresse em dois grupos principais: o de resposta rápida, que está relacionado a um programa de defesa preexistente na planta e outro denominado adaptação, onde o tempo influencia de maneira crucial na elaboração dessa resposta. A adaptação é uma resposta prolongada durante a qual as plantas ajustam sua fisiologia às condições ambientais numa maneira orientada pelo meio.

Quando uma planta responde ao estresse através de sua resistência (resposta pré-adaptativa) ela expressa um programa preexistente que lhe permite sobreviver ao estresse mantendo (aproximadamente) seu programa original de desenvolvimento, onde o estresse é considerado como o gatilho da expressão genética.

A resistência reflete a capacidade da planta de expressar, sob estresse, seu programa de desenvolvimento original. Em geral, a expressão deste programa preexistente ocorre relativamente rápido, em 48h de exposição ao estresse. A reação não é específica ao estresse particular e rapidamente estabiliza ao nível atual. A diminuição do crescimento é proporcional à intensidade do estresse e inversamente proporcional à tolerância (capacidade pré-adaptativa) da planta. Durante a adaptação, a planta estabelece um novo programa de desenvolvimento como função das condições precisas de estresse. No início do processo de adaptação existe uma considerável diminuição no crescimento, que é comumente mais importante do que a preadaptação. Uma vez a planta esteja adaptada, a velocidade de crescimento aumenta, e pode atingir níveis semelhantes aos da taxa de velocidade de crescimento relativo (RGR – "relative growth rate") comparado ao das plantas-controle de mesma idade. Um aumento da RGR no final do processo de adaptação indica que o fator de estresse não está mais ativo sobre a planta. A resposta adaptativa inclui modificações no balanço hormonal, nos processos metabólicos e na expressão do genoma. Em contraste, a resposta preadaptativa não é completamente pre-programada no genoma. Enquanto a resposta adaptativa não é programada, a capacidade de responder ao estresse por adaptação é geneticamente controlada. Nem toda espécie é capaz de adaptar-se. Dentro de uma mesma espécie capaz de sofrer adaptação, nem todo cultivar é capaz de ter a mesma característica. Mais ainda, dentro de uma espécie, nem todo o cultivar que se adapta o faz com a mesma intensidade (Amzallag & Lerner, 1995).

Quando ocorrem severas mudanças nas condições ambientais, a célula pode responder de uma maneira específica e rápida selecionando o aumento ou diminuição da expressão de genes específicos. Os genes cuja expressão é aumentada durante o tempo de estresse presumivelmente são críticos para a adaptação do organismo à condição adversa. Um exame dos genes que são ativados em resposta ao estresse pode mostrar-se útil no entendimento da resposta biológica das plantas ao estresse. Os sistemas genéticos que respondem ao estresse são de interesse não somente devido ao seu papel de apoiar a planta sob estresse, como também por sua utilidade no estudo dos eventos moleculares que controlam o nível quantitativo da expressão gênica (Amzallag & Lerner, 1995).

Nem toda resposta metabólica ao estresse é considerada deletéria ou prejudicial, e o maior desafio para os bioquímicos é distinguir entre as respostas que representa um sintoma prejudicial e aquelas respostas que são verdadeiramente adaptativas, que favorecem o crescimento continuado durante a recuperação ao estresse. Na verdade para qualquer variável no metabolismo deve existir uma faixa ótima, onde abaixo dela a planta sofrer privação, ultrapassando essa faixa pode levar à toxicidade (Amzallag & Lerner, 1995).

2.7.1. Estresse salino

A salinidade é considerada como uma ocorrência de alta concentração de sais solúveis no solo ou em solução durante o crescimento das plantas (Flowers & Yeo, 1986). De um modo geral, um solo é considerado salino quando ele é prejudicial ao crescimento da planta. Na maioria dos casos a origem dos íons deve-se a uma influência de origem oceânica quer do passado quer do presente. Embora a concentração dos diferentes solutos da água dos mares varie, a proporção relativa dos sais dissolvidos difere muito pouco.

Desse modo, os íons mais importantes, em se tratando de solo salino que são o sódio e o cloro, são igualmente os sais dominantes no mar. São também freqüentes em solos salinos os íons: sulfato, bicarbonato, cálcio, magnésio, potássio e nitrato, sendo estes dois últimos menos freqüentes (Mackensie & Leshen, 1994).

O excesso de sais no solo pode restringir o crescimento das plantas. Este é um dos principais problemas nas regiões áridas e semi-áridas. Nessas regiões, ocorrem altas taxas de evaporação, o que faz com que a concentração de sais no solo e na água aumente. No nordeste brasileiro é possível que este problema se agrave devido às condições climáticas desfavoráveis que esta região apresenta (região semi-árida), com baixos níveis de precipitações pluviométricas e o deficiente sistema de drenagem existente. O manejo inadequado dos recursos hídricos dos solos e de alguns insumos durante o desenvolvimento da agricultura tem levado as terras irrigadas a um processo de salinização. Esse problema tem-se agravado chegando a atingir cerca de 40% da terras irrigadas (Szabolcs, 1994).

A recuperação de um solo inutilizado, em geral, envolve grandes investimentos e raramente é economicamente viável. Uma maneira de resolver o problema da salinidade seria desenvolver, através de técnicas de engenharia genética, plantas que fossem resistentes ou tolerantes ao excesso de sais. Para atingir esse objetivo é necessário que se conheça a fisiologia e a bioquímica do estresse salino. Um tema que tem emergido é o da grande variedade de respostas ao sal, não somente entre diferentes espécies vegetais, como também entre os diferentes órgãos de uma mesma planta, incluindo modulações no seu desenvolvimento.

As plantas, em relação a sua resposta à alta concentração de sais, são divididas em dois grupos principais: as halófitas, que são nativas de solo salino e são capazes de germinar, crescer, florescer e frutificar normalmente nesse solo e as glicófitas que são sensíveis, sofrem inibição no seu crescimento e não completam seu ciclo de vida em certas concentrações de sal. Algumas espécies consideradas altamente tolerantes ao sal, como a *Suaeda maritima* e a *Atriplex nummularia*, apresentam estímulo no crescimento em concentrações ainda mais altas do que aquelas que seriam letais para espécies consideradas sensíveis (Taiz & Zeiger, 1991). Sendo esse conceito de natureza qualitativa, não existe uma delimitação rígida entre esses dois grupos de plantas. Algumas glicófitas comportam-se como halófitas e vice-versa. As respostas das plantas à salinidade são bastante variadas o que torna difícil a classificação das mesmas nesses dois grupos. Além disso, outros fatores como solo, umidade relativa do ar, luminosidade, temperatura e disponibilidade de água e nutrientes torna ainda mais complexa as respostas das plantas à salinidade (Shannon *et al.*, 1994). Cada organismo apresenta uma faixa de tolerância própria à salinidade, a qual inclui suas condições ótimas de crescimento, embora grandes faixas de concentração de sal (faixa de resistência) possam ser compatíveis com a sobrevivência da célula. As plantas cultivadas são particularmente limitadas em sua faixa de tolerância, enquanto que outros organismos fotossintetizantes, como microalgas e cianobactérias, possuem uma larga faixa de aclimação.

O grau de tolerância à salinidade nas diferentes espécies é influenciado, não só por fatores internos (variabilidade genética e estágio de desenvolvimento), como também pelas condições edáfo-climáticas, nas quais as plantas são cultivadas (Maas, 1996). A salinidade afeta as plantas em todas as fases de seu desenvolvimento, porém, a fase ou estágio mais sensível é uma característica da espécie, variedade ou cultivar (Maas, 1990). Sementes em germinação diferem de plantas adultas em sua tolerância ao sal. A alta sensibilidade à

salinidade de sementes em germinação representa um fator principal na determinação da distribuição de plantas em ambientes salinos e previne o estabelecimento de várias espécies de planta.

A capacidade da planta em sobreviver e crescer em condições salinas envolve uma integração de mecanismos celulares adaptativos multicelulares e intracelulares. É problemático, senão impossível, conhecer precisamente a contribuição relativa de cada tipo de mecanismo de tolerância ao sal, nas plantas. Porém, os mecanismos de importância crucial são aqueles mecanismos celulares de adaptação que facilitam o ajuste osmótico, que medeiam o acúmulo de íons e a compartimentalização intracelular (Binzel *et al.*, 1988).

O efeito da salinidade no desenvolvimento da planta pode ser dividido em duas fases (Munns & Schachtman, 1993). Na primeira, a salinidade leva a uma diminuição do potencial hídrico do solo, fazendo com que a planta absorva menos água, o que afeta o funcionamento normal da célula comprometendo seus processos fisiológicos e metabólicos, e levando à redução no crescimento da planta. A segunda fase inicia-se após um certo período de tempo em que a planta foi submetida à salinidade, caracterizando-se pelos efeitos iônicos dos sais. Os íons Na^+ e Cl^- acumulados nas células do mesófilo levam a um desequilíbrio iônico, com consequências na nutrição e no metabolismo celular (Bloom & Epstein, 1984). A duração dessas fases vai depender da espécie vegetal e da quantidade de sais existentes no ambiente radicular. Apesar da importância dos efeitos exercidos pelo estresse hídrico no crescimento, a capacidade de exclusão e a compartimentalização de íons por parte das glicófitas são de fundamental importância para sua adaptação à salinidade (Jeschke, 1984). A capacidade de manter uma taxa relativamente alta de K^+/Na^+ no citoplasma e de sequestrar NaCl para fora dos sítios do

metabolismo celular, são dois dos mais críticos requerimentos para que haja crescimento da planta em condições salinas (Wyn Jones, 1981). Embora não se conheça o exato mecanismo responsável por facilitar a entrada dos íons Na^+ e Cl^- para dentro do vacúolo, já está claro que a força próton motriz para esse transporte é o $\Delta\mu\text{H}^+$, gerado pelo transporte de H^+ através do tonoplasto. (Reuveni *et al.*, 1990).

2.8. Efeito da Salinidade nos Estágios Iniciais de Desenvolvimento da Planta

De acordo com Bewly & Black (1994), o processo germinativo e de desenvolvimento da plântula pode ser dividida em duas etapas distintas: a primeira denomina-se germinação, a qual se inicia com a embebição da água e termina com a emergência da radícula ou de outra parte do embrião. A segunda, caracteriza-se pela intensa mobilização de reservas associada com o crescimento do eixo embrionário e que resulta no estabelecimento da plântula.

A semente, ao ser colocada em um ambiente adequado sofre um processo essencialmente físico em que há embebição de água pelos colóides existentes, levando ao amaciamento do tegumento e hidratação do protoplasma das células. Durante essa fase, em que se observa um aumento no tamanho da semente, ocorre a solubilização de proteínas necessárias à ativação de certas enzimas, bem como a reorganização e a ativação do sistema sintetizador de proteínas e do sistema produtor de energia nas mitocôndrias. Inicia-se, também, a síntese *de novo* de várias enzimas (Bewly & Black 1994). Em consequência dessas mudanças ocorre a emergência da radícula ou outra parte do embrião. Durante o estabelecimento da plântula, que segue à emergência da radícula, a absorção de água aumenta exponencialmente e a taxa respiratória segue a mesma tendência. O eixo embrionário aumenta de tamanho e há um incremento, tanto no peso fresco como no peso seco desse

orgão e diminuição do órgão de reserva. As substâncias de reserva, principalmente carboidratos, lipídios e proteínas, são transformadas em produtos solúveis e mobilizadas a partir dos cotilédones, endosperma e perisperma e utilizadas como substrato da respiração ou nos processos fisiológicos necessários ao alongamento, divisão e diferenciação celulares (Bewly & Black, 1978).

Após a emergência da radícula, o crescimento do eixo embrionário pode dar origem a dois tipos de estabelecimentos de plântulas: no primeiro, que tem como exemplo a ervilha, os cotilédones permanecem sob o solo (hipógeo), enquanto a plúmula cresce para dar origem ao epicótilo, que neste caso é a parte aérea da plântula; no segundo tipo, que ocorre no feijão-de-corda (Wien & Summerfield, 1984), os cotilédones emergem do solo (epígeo) em decorrência do crescimento do hipocótilo (porção localizada entre os cotilédones e a radícula), desenvolvendo-se a plúmula, acima dos cotilédones. Nesse caso, a parte aérea da plântula é composta de hipocótilo e de epicótilo.

Quando a concentração de sais no solo ou no meio de cultivo aumenta, ocorre uma diminuição na velocidade e na percentagem de germinação (Enéas Filho, 1979, Castro, 1982). Em glicófitas, o processo até a emergência da radícula é menos afetado pela salinidade do que aquele do estabelecimento da plântula (Prisco, 1987) em oposição ao que Ungar (1978) afirma ocorrer com certas halófitas, as quais requerem concentrações de sais mais baixas durante a germinação do que nas etapas subsequentes, ou seja, durante o estabelecimento da plântula.

Gomes Filho & Prisco (1978) demonstraram através das medidas de peso seco de cotilédones de plântulas de *Vigna unguiculata* que a salinidade retardava a hidrólise e/ou o transporte de produtos de hidrólise das reservas para o eixo embrionário, afetando

drasticamente o crescimento desse último. Sendo assim, algumas possibilidades foram levantadas de como a salinidade poderia afetar a mobilização de reservas cotiledonárias: (i) inibindo a síntese *de novo* de enzimas responsáveis pela hidrólise das reservas cotiledonárias; (ii) inibindo a atividade destas hidrolases; (iii) impedindo a solubilização destas enzimas e finalmente, (iv) impedindo a translocação dos produtos de hidrólise dos cotilédones para o eixo embrionário (Prisco, 1987). A salinidade ao inibir o desenvolvimento da planta em suas etapas iniciais, o faz porque afeta, principalmente, a segunda fase do processo germinativo, ou seja, a de estabelecimento da plântula (Prisco & O'Leary, 1970).

2.9. Mudanças nas Bombas Vacuolares Durante o Crescimento Celular.

O caule de plântulas cresce rapidamente e este crescimento é acompanhado pela alongação das células. Um grande aumento no volume celular não pode ser obtido sem o desenvolvimento do vacúolo. De acordo com Maeshima (1990), podemos dividir o hipocótilo de *Vigna radiata* em três regiões principais: região de divisão, região de alongação e região de maturação (Maeshima 1990). A rápida alongação ocorre na parte central do hipocótilo. A divisão celular ocorre somente no meristema apical no topo do hipocótilo. A metade inferior do hipocótilo consiste de grandes células maduras (Maeshima 1996). Foi observado o tamanho das células nestas 3 regiões do hipocótilo. Para isso os protoplastos de hipocótilos, com 3 dias de germinação, foram preparados a partir dessas regiões e o seu diâmetro foi medido a partir de micrografias. Os diâmetros médios obtidos para as regiões de divisão, alongação e de maturação foram 40, 86 e 126 μm , respectivamente. O volume das células aumenta mais de 20 vezes durante a alongação. Baseado nesse resultado, pode-se dizer que, o grande aumento no volume celular deve-se mais ao aumento no tamanho do vacúolo do que ao aumento no volume

citoplasmático. Foi mostrado, que o nível de ATP é maior nas regiões de divisão e alongação do que na região de maturação e que o nível de PPI é o mesmo nas diferentes regiões. Observou-se também que a região de divisão possuía níveis mais altos de atividade ATPásica e pirofosfatase vacuolar do que as regiões de alongação e maturação (Maeshima 1990). Para que ocorra a manutenção da pressão de turgor requerida para uma contínua alongação celular, os solutos devem ser ativamente acumulados em vacuolos em crescimento para que a osmolaridade seja mantida alta e o vacúolo em crescimento deve transportar prótons ativamente com uma velocidade maior do que a que ocorre em pequenos vacúolos (Maeshima, 1996).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

1. Determinar a localização das bombas de prótons (V-ATPase e H⁺-PPase) nas distintas endomembranas;
2. Caracterizar as propriedades funcionais e de regulação das bombas de prótons vacuolares (V-ATPase e H⁺-PPase);
3. Determinar os parâmetros indicativos do estresse salino em dois cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp: Vita 3 e Vita 5 dotados de diferentes graus de tolerância ao estresse salino;
4. Estudar o funcionamento das bombas de prótons (V-ATPase e H⁺-PPase) durante a etapa de estabelecimento da plântula;
5. Determinar a participação das bombas de prótons vacuolares (V-ATPase e H⁺-PPase) no estresse salino.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Sementes

Foram utilizadas sementes de feijão de corda *Vigna unguiculata* (L.) Walp, anteriormente denominada *Vigna sinensis* (L.) Savi e corrigida segundo Verdcourt (1970). As experiências foram realizadas em 2 cultivares com diferentes níveis de tolerância ao estresse salino: Vita 3 e Vita 5 sendo o cultivar Vita 3 mais tolerante ao estresse salino do que a cultivar Vita 5. As sementes foram provenientes do Centro Nacional do Arroz e Feijão da EMBRAPA, Goiânia, GO e multiplicadas na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Ceará (safra de 1995 – 1997). Após a colheita as sementes foram armazenadas em frascos de vidro a uma temperatura de aproximadamente 4°C.

4.2. Métodos

4.2.1. Germinação

As sementes foram previamente selecionadas no intuito de obter-se uma uniformidade de cor e tamanho e esterilizadas durante 5 minutos com uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) contendo 5,2 % de cloro ativo diluída 1:5 (v/v), para eliminação de possíveis esporos de fungos presentes no tegumento das sementes. Em seguida, o NaOCl foi retirado lavando-se as sementes exaustivamente em água corrente e

depois com água destilada, por 5 vezes. As sementes foram deixadas em água destilada por aproximadamente 1 hora, para que atingissem o dobro do tamanho inicial, e selecionadas novamente para obter uma maior uniformidade na germinação. Em seguida, foram semeadas em papel de filtro, esterilizado a 120 °C durante 15 min. umedecido com água destilada (controle) ou com soluções de diferentes concentrações de NaCl (estresse). A germinação ocorreu em ausência de luz e a uma temperatura de aproximadamente 28 °C.

4.2.2. Isolamento de Vesículas Enriquecidas de Tonoplasto Complexo de Golgi e do Retículo Endoplasmático

As vesículas do complexo de Golgi e do retículo Endoplasmático foram isoladas de acordo com Okorokov & Lehle (1998). Todas as etapas de isolamento foram processadas a uma temperatura de aproximadamente 4 °C, sendo as soluções e vidraria previamente resfriadas.

O isolamento foi realizado a partir de hipocótilos de plântulas estioladas germinadas conforme a descrição anterior. Os hipocótilos foram cortados em seções de aproximadamente 10 cm de comprimento e em seguida lavados em água destilada resfriada. Esses hipocótilos foram a seguir macerados utilizando-se gral e pistilo em meio de homogeneização na proporção de 1:1 (v/v), contendo: manitol 600 mM, MgSO₄ 3 mM, EDTA 5 mM, EGTA 3 mM, PVP 40 a 0,5 % (p:v), tris 100 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, pH 8. O homogenato resultante foi filtrado em tela de nylon para remoção de tecidos não rompidos sendo, em seguida, submetido a uma centrifugação diferencial em centrífuga refrigerada IEC B -22M (International Equipment Company) em 4500 x g durante 10 minutos. O precipitado formado, composto por amido, restos celulares e núcleos, foi desprezado e o sobrenadante, contendo a fração vacuolar, foi precipitado à

100.000 x g durante 45 min, usando uma ultracentrífuga Sorvall Combi Plus. As membranas totais contidas no precipitado foram resuspensas, com a ajuda de um bastão, em meio contendo sacarose 12,5 %, EDTA 1mM, EGTA 1mM, HEPES 5 mM, benzamidina 1 mM, DTT 2 mM, PMSF 1 mM, pH 7,5 que foi superposto a um gradiente contendo as soluções com diferentes concentrações de sacarose: 50 %, 40%, 30 % e 20% preparadas em meio contendo EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, HEPES 5 mM, benzamidina 1 mM, DTT 2 mM, PMSF 1 mM, pH 7,5. Esse gradiente foi submetido a uma centrifugação de 150.000 x g. em um rotor swinging SW 41 Ti, utilizando uma ultra centrífuga Beckman, modelo L7-55, durante 2 horas. Ao final desse tempo foram formadas bandas de vesículas enriquecidas de tonoplasto, tonoplasto e complexo de Golgi, complexo de Golgi e retículo endoplasmático entre os gradientes de 12,5-20 %, 20-30 %, 30-40 % e 40-50 % de sacarose, respectivamente. As membranas foram armazenadas em nitrogênio líquido e utilizadas dentro de uma semana.

4.2.3. Isolamento de Mitocôndrias

Utilizou-se o método de Ikuma (1970), modificado por Silva Lima *et al.*, (1977), no processo de isolamento das mitocôndrias. Todas as etapas de isolamento foram processadas em baixa temperatura (4 °C), sendo as soluções e a vidraria previamente resfriada.

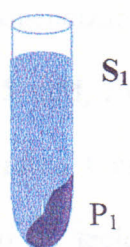
As mitocôndrias foram isoladas a partir de tecidos vegetais (hipocótilos e epicótilos) de plântulas estioladas conforme descrição anterior. Os tecidos vegetais foram cortados em secções de aproximadamente 3 cm de comprimento e em seguida lavados duas vezes em água destilada resfriada e uma vez com meio de homogeneização com a seguinte composição: manitol 0,3 M, tris-HCl 6 mM, EDTA 1 mM, BSA 1%, cisteína 4 mM, ajustado para um pH final de 8 com KOH. Esses hipocótilos foram, a seguir, macerados em meio de

homogeneização na proporção de 1:1 (v/v) utilizando-se um liquidificador modelo HL 3252 (Walita), em velocidade mínima durante 1 segundo por 3 vezes e em velocidade máxima durante, igualmente, 1 segundo por 3 vezes. O pH do homogenato manteve-se em torno de 7, não sendo necessário adicionar-se KOH, como é comum em preparações de origem vegetal. O homogenato resultante foi filtrado em tela de nylon para remoção de tecidos não rompidos. A seguir, o filtrado foi submetido a uma centrifugação diferencial em centrífuga refrigerada RC-5 (Sorval) a 500 x g durante 10 minutos. O precipitado formado, composto por amido, restos celulares e núcleos, foi desprezado e o sobrenadante, contendo a fração mitocondrial, foi submetido a uma centrifugação de 12000 x g por 20 minutos. O precipitado, contendo mitocôndrias sedimentadas, foi ressuspensão em 25 ml de meio de lavagem contendo manitol 0,3 M, tampão tris-HCl 3 mM, BSA 0,1%, e com pH final de 7,2, ajustado com HCl. A ressuspensão do precipitado foi feita com o auxílio de um pincel nº 12 (marca comercial Tigre) passado levemente sobre o mesmo. O homogenato então foi centrifugado a 500 x g durante 10 minutos, para eliminar possíveis restos de amido e tecidos celulares remanescentes. O precipitado foi desprezado sendo o sobrenadante centrifugado a 12000 x g durante 20 minutos e o novo sobrenadante formado foi retirado, conservando-se o precipitado, no qual estava contida a fração mitocondrial. Tal precipitado foi ressuspensão em aproximadamente 1ml do meio de lavagem e conservado a uma temperatura de 4 °C (Figura 7).

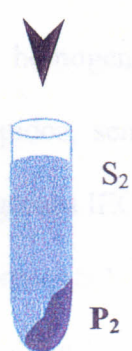
4.2.4. Isolamento de Vesículas Enriquecidas de Tonoplasto

As vesículas enriquecidas de tonoplasto foram isoladas de acordo com Marieux *et al.*, (1994) com algumas modificações, como mostra o esquema da Figura 8. Todas as etapas de isolamento foram processadas a uma temperatura de aproximadamente 4 °C, sendo as soluções e vidraria previamente resfriada.

Tecido vegetal
maceração, filtração,
500 g
x 10 min



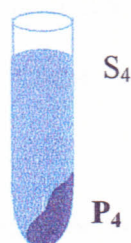
12 000 g
x 20 min



500 g
x 10 min



12 000 g
x 20 min



Mitocondrias
brutas

Figura 7. Esquema de extração de mitocôndrias a partir tecidos vegetais (hipocótilo e epicótilo) de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5.

O isolamento foi realizado a partir de hipocótilos de plântulas estioladas germinadas conforme a descrição anterior. Os hipocótilos foram cortados em secções de aproximadamente 10 cm de comprimento e em seguida lavados em água destilada resfriada. Esses hipocótilos foram a seguir macerados utilizando-se gral e pistilo em meio de homogeneização na proporção de 1:1 (v/v), contendo: manitol 600 mM, $MgSO_4$ 3 mM, EDTA 5 mM, EGTA 3 mM, PVP 40 0,5 %, tris 100 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, pH 8. O homogenato resultante foi filtrado em tela de nylon para remoção de tecidos não rompidos, sendo em seguida submetido a uma centrifugação diferencial em centrífuga refrigerada IEC B -22M (International Equipment Company) em 4500 x g durante 10 min. O precipitado formado, composto por amido, restos celulares e núcleos, foi desprezado e o sobrenadante, contendo a fração vacuolar, foi superposto à solução contendo sacarose 25 %, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, HEPES 5 mM, Benzamidina 1 mM, DTT 2 mM, PMSF 1 mM, pH 7,5. Esse gradiente foi centrifugado em 150 000 x g por 1 h, utilizando uma ultracentrífuga Beckman, modelo L7-55 e o rotor swinging SW 41 Ti. O tempo de centrifugação foi suficiente para a formação de uma banda localizada na interface entre o sobrenadante e a solução de sacarose 25 %. As vesículas de tonoplasto foram removidas e diluídas (1:1) em meio de lavagem contendo: $MgSO_4$ 3 mM, EDTA 1 mM, EGTA 3 mM, HEPES 50 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, pH 7 e em seguida, submetidas a uma centrifugação de 150 000 x g durante 50 minutos. O precipitado resultante foi resuspenso em meio contendo glicerol 90 %, $MgSO_4$ 3 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, HEPES 10 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM e benzamidina 1 mM, pH 7, e então submetido a uma homogeneização em potter. As membranas foram armazenadas em nitrogênio líquido e utilizadas dentro de uma semana (Figura 8).

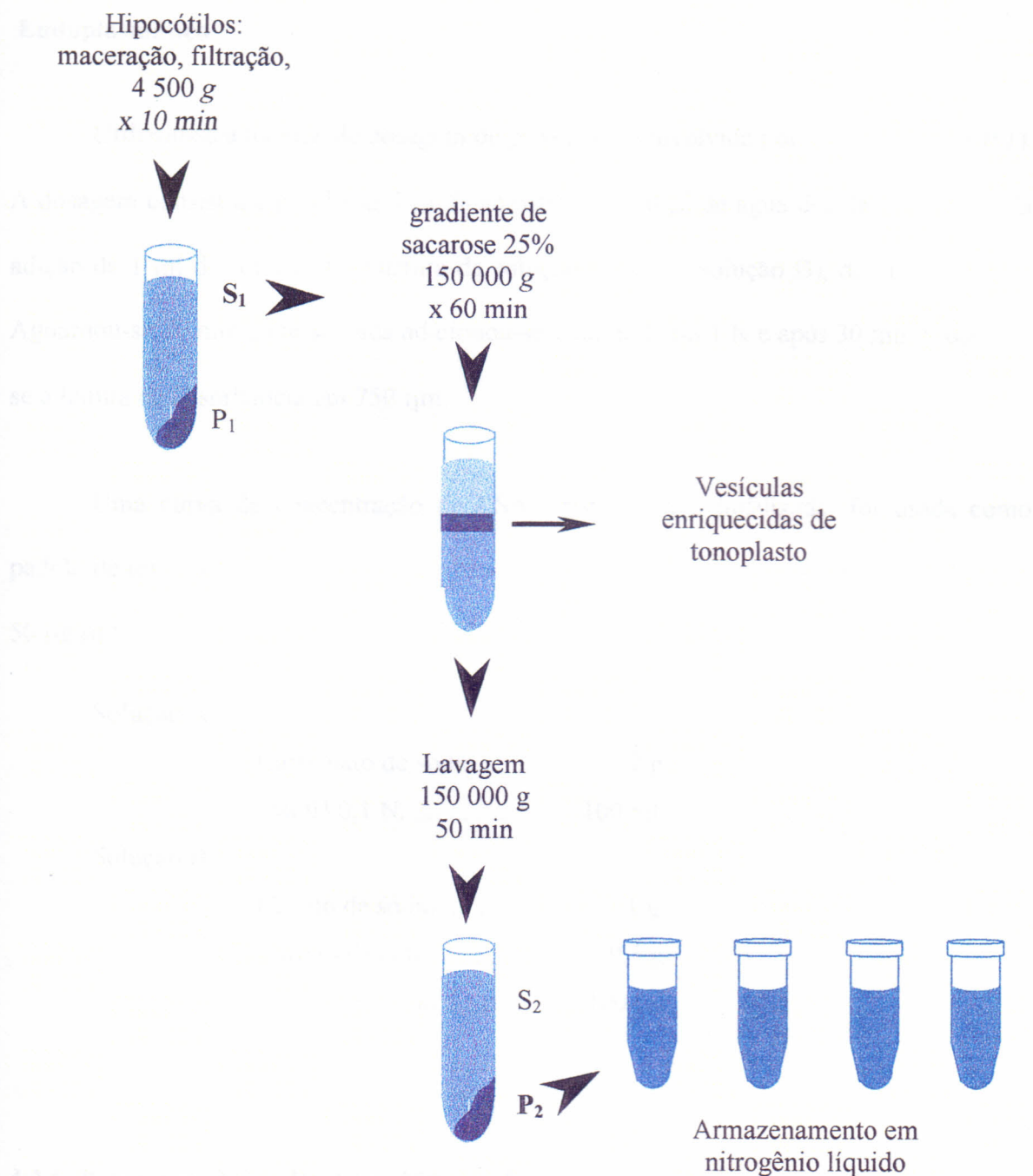


Figura 8. Esquema de isolamento de vesículas enriquecidas de tonoplasto de hipocótilo de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5.

4.2.5. Determinação da Proteína de Tonoplasto, do Complexo de Golgi e do Retículo Endoplasmático

Utilizou-se a técnica de dosagem de proteína desenvolvida por Lowry *et al.* (1951). A dosagem consistiu em colocar 5 μl da amostra em 190 μl de água destilada, seguido da adição de 1 ml da solução C (mistura da solução A com a solução B), descrita a seguir. Aguardou-se 10 min e em seguida adicionou-se 1 ml de Folin 1 N e após 30 min procedeu-se a leitura de absorbância em 750 nm.

Uma curva de concentração de BSA, cristalizada e liofilizada, foi usada como padrão de referência, onde leituras de absorbância foram feitas nas concentrações entre 0 e 50 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

Solução A

Carbonato de sódio.....2 g
NaOH 0,1 N.....100 ml

Solução B

Citrato de sódio.....1 g
Sulfato de cobre.....0,5 g
H₂O bidestilada q.s.p.....100 ml

4.2.6. Determinação da Proteína Mitocondrial

Utilizou-se o método do Biureto, modificado por Gornall *et al.* (1949) para determinar a concentração de proteína na preparação mitocondrial. A modificação consistiu na adição da solução de colato de sódio, responsável pela solubilização das proteínas membranares. A reação processou-se com adição e sucessiva homogeneização

dos seguintes reagentes à uma alíquota de 50 μ l da preparação mitocondrial: 0,2 ml de colato de sódio 0,25 %, 0,45 ml hidróxido de sódio 8 % e 0,3 ml de sulfato de cobre 0,1 %. Após 15 minutos de reação, necessários ao desenvolvimento da cor violeta, foi feita uma leitura de absorvância em 540 nm em um espectrofotômetro marca Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 2000.

Uma curva de concentração de BSA, cristalizada e liofilizada foi usada como padrão de referência, através da qual foi determinado que 1 mg de proteína correspondia à uma absorvância média de 0,088.

4.2.7. Medida da Atividade de Hidrólise da V-ATPase e H⁺-PPase

A atividade ATPásica sensível ao nitrato (Δ NO₃-ATPase) e a PPIase estimulada pelo K⁺ (Δ K⁺-PPase) ocorreu em presença do tampão BTP-MES 25 mM, pH 7,2, MgSO₄ 2,5 mM, ATP-BTP 1mM ou PPI-BTP 1mM, NaMoO₄ 0,2 mM, NaN₃ 2 mM, Na₃VO₄ 250 μ M e KCl 70 mM. A atividade de hidrólise da Δ NO₃-ATPase foi determinada na presença e ausência de KNO₃ 100 mM (O'Neill *et al.* 1983). A atividade de hidrólise da Δ K⁺-PPase foi calculada pela diferença entre as atividade medidas em presença e ausência de KCl 70 mM (Wang *et al.* 1986). A atividade PPásica foi calculada como a metade da taxa de Pi liberado a partir da hidrólise do PPI (μ moles de PPI consumido por unidade de tempo). A concentração de Pi foi determinada em relação a uma curva padrão de KH₂PO₄.

A atividade de hidrólise de ATP e do pirofosfato foi determinada num meio de reação de 0,5 ml. A reação iniciou-se com a adição de 40 μ g/ml da preparação de vesículas enriquecidas de tonoplasto. Após a reação durante 30 min à 32 °C a quantidade de Pi

liberado foi quantificado pelo método modificado de Fiske e Subbarow (1925), utilizando-se as soluções com as seguintes composições:

Solução A – Solução de Fiske

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

Solução B - Solução de ácido ascórbico 10 % (p/v)

A mistura da solução A e B foi feita utilizando 24,75 ml de A e 0,25 ml de B minutos antes de ser utilizada, pois trata-se de uma solução instável.

Ao final de 30 min de reação adicionamos 2 ml da mistura da solução A (solução de Fiske) com a solução B (solução de ácido ascórbico). Após 10 minutos, tempo necessário para o desenvolvimento da coloração, as leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro marca Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 2000, em 750 nm.

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

$$\text{Atividade Específica} = \text{Abs. do meio reacional} \times 0,3 \text{ } \mu\text{moles de Pi} \div \text{Abs de } 0,3 \text{ } \mu\text{moles de Pi} \div 30 \text{ min} \div 0,02 \text{ mg de Proteína}$$

4.2.8. Determinação do Transporte de Prótons pela V-ATPase e H⁺-PPiase

O transporte de prótons dependente de ATP e PPI através da membrana das vesículas foi determinado à 32 °C como a taxa inicial da supressão de fluorescência da sonda fluorescente 9-amino 6-chloro-2-methoxyacridine (ACMA). Para a H⁺-ATPase, o meio de reação (2 ml) era formado pelo tampão BTP-MES 25 mM, pH 7,2, ATP-BTP 1mM, MgSO₄ 2,5 mM, Vanadato 0,1 mM, NaN₃ 2 mM, ACMA 1 μM, 100 μg de proteína de membrana de vesículas, e KCl 70 mM. Para a H⁺-PPase, o meio de reação utilizado foi o mesmo acima, exceto pelo PPI-BTP 0,1 mM em vez de ATP-BTP 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de ATP-BTP ou PPI-BTP ao meio de reação, para a determinação da atividade de transporte de prótons da H⁺-ATPase e H⁺-PPase, respectivamente. A medida de fluorescência foi registrada por um espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F-2000 tendo como comprimento de onda de excitação e emissão de 415 e 485 nm, respectivamente. O transporte de prótons é representado pela taxa de supressão da fluorescência que é expressa em % F.min⁻¹ mg⁻¹ de proteína. Inicialmente, devemos calcular a fluorescência que depende de V_o, F_o. Para isso, tomamos a reta tangente ao gráfico no seu ponto de queda inicial. A partir dessa tangente marcamos, graficamente, o tempo de 1 min que irá definir no eixo das ordenadas o valor F_o. Prosseguindo, tomamos, graficamente, o valor F_{max}, representado pela ordenada que vai desde o ponto de queda até o eixo das abcissas. De posse desses resultados, podemos calcular o valor V_o conforme a fórmula abaixo:

$$V_o = (F_o / F_{\text{máx}} \times t (\text{min.})) \times 100 \%, \text{ onde}$$

V_o é a velocidade inicial de formação do ΔpH;

F_o é o valor de fluorescência, determinada graficamente, dependente de V_o em um tempo t;

F_{máx} é a fluorescência máxima (total);

T é o tempo em minutos.

Finalmente, calculamos V_o em 1 mg de proteína:

$$V = V_o \times 1000 \mu\text{g} / \text{quantidade de proteína usada } (\mu\text{g})$$

4.2.9. Determinação da Atividade Hidrolítica da ATPase mitocondrial

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados em preparações mitocondriais previamente lisadas com triton X-100, 0,01 % e diluídas com tampão tris-HCl 60 mM, pH 8 de modo a resultar numa concentração final de 2,5 mg de proteína por ml. Em seguida, a preparação mitocondrial foi submetida, antes do início da reação, a uma pré-incubação a 30 °C durante 10 min para que fosse atingido o equilíbrio térmico. A reação foi desencadeada com a adição de soluções de ATP ao meio de reação

O volume final de reação foi de 5 ml, de onde foram retiradas duas alíquotas de 1 ml: uma imediatamente após a adição da solução de ATP (branco) e outra com 15 minutos de reação. Essas alíquotas foram imediatamente colocadas em contato com as soluções reagentes para a determinação de fósforo inorgânico, quando então cessa a reação enzimática. A atividade específica foi expressa em miliunidades de atividade ATPásica (mU)/ mg de proteína, sendo uma unidade (U) definida como a quantidade de proteína mitocondrial que hidrolisa um mmol de ATP por minuto.

Alíquotas de 1ml do meio de reação foram adicionadas à uma solução de 2 ml de TCA/SDS nas concentrações de 0,4 % e 6 %, respectivamente (Arnold *et al.*, 1976). Em seguida, foram adicionados 0,6 ml de uma solução de molibdato de amônia (molibdato de amônia 5 % (p/v), H₂SO₄ 10 % (v/v)) e 0,5 ml uma solução de Elon (metabisulfito de sódio 3 % (p/v), metol 1 % (p/v)). Após 15 minutos, tempo necessário para o

desenvolvimento da reação com o aparecimento de uma coloração violeta, cuja tonalidade é proporcional à presença de Pi, as concentrações de Pi foram determinadas, tomando-se os valores de 0,3 mmoles de Pi, cuja D.O. é de 0,350.

4.3. Parâmetros de crescimento

As medidas de crescimento das plântulas tratadas com NaCl 100 mM e controle foram realizadas após 3 e 7 dias de germinação. As medidas de crescimento foram feitas medindo-se os comprimentos da raiz, do hipocótilo, do epicótilo das plântulas. A matéria fresca foi pesada para cada parte da plântula. Uma vez pesada, a matéria fresca das partes da plântula foram postas para secar em uma estufa à 60 °C durante 72 h, sendo em seguida pesadas.

4.4. Dosagem de Elementos Minerais (Na⁺ e K⁺)

A dosagem dos elementos minerais foi realizada nas raízes, hipocótilo e epicótilo de plântulas tratadas com NaCl 100 mM e controle após 7 dias de germinação.

A dosagem dos elementos minerais foi feita a partir da matéria seca (M.S.) dos diferentes órgãos das plantas estressadas e controle. Após a secagem, a matéria seca foi moída com a ajuda do gral e pistilo que permite reduzi-la até o pó.

O pó seco (10 mg) foi colocado num tubo de ensaio com 1 ml de água. Após 10 min em banho-maria à 100 °C, o extrato foi centrifugado à 6.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi diluído 20 vezes com água destilada.

As amostras foram dosadas utilizando a técnica de fotometria de chama. Os elementos minerais foram pulverizados numa chama que permite a dissociação dos sais ao estado de átomos ou de radicais. Esses são excitados por energia térmica de chama e seu retorno ao estado fundamental é acompanhado da emissão de uma radiação de frequência própria ao elemento posto em solução e cuja intensidade é função de sua concentração.

O fluxo luminoso emitido atravessa um filtro interferencial específico do elemento a dosar, e depois ele é mantido por um receptor fotosensível. O aparelho é padronizado com a ajuda de uma solução padrão (0,5 mEq/L) composta de uma mistura de NaCl e KCl.

O resultado foi calculado usando os seguintes dados:

PM (K⁺=39,1) (Na⁺=23)

1 Eq = PM / carga

Diluição da Amostra = 0,5 ml em 9,5 ml (20X)

$$\text{Resultado (mmol g}^{-1}\text{ MS)} = (\text{leitura de absorvância} \times 1 \text{ Eq} / 2) / 100) \times 20 \text{ (diluição)} \times \\ (5\text{mL} / 1000 \text{ mL}) \times (1000 \text{ mg} / 10 \text{ mg}) \times 1 / \text{PM íon}$$

4.5. Determinação de Malondialdeído

Quando ocorre um estresse, as espécies químicas tóxicas geradas a partir do oxigênio reagem com numerosas outras moléculas da célula e especialmente com os lipídios das membranas. Essa peroxidação lipídica gera moléculas como o malondialdeído, que tem a propriedade de reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA), permitindo estimar a amplitude da lipoperoxidação.

A presença de malondialdeído, principal produto da peroxidação de lipídios, foi determinado pelo método colorimétrico de Heath & Parcker (1968). Foram utilizados 100 ug da amostra protéica de cada condição testada. A amostra protéica foi adicionada ao tampão fostato, pH 7,0 a um volume de 1ml e então adicionado a mistura de 1:1 com TBA 0,5 % (p/v) e TCA 20 % (p/v). A solução foi levada a 100 °C por 30 min e em seguida centrifugada a 3000g por 10 minutos e a densidade óptica foi registrada através de um espectrofotômetro marca Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 2000, em 532 nm.

4.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Contendo SDS

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, na presença de β -mercaptoetanol, foram desenvolvidos de acordo com o método de Laemmli (1970), adaptados para o uso de placas de vidro (10 x 7,2 cm). Para a montagem das placas foram usados géis com 8,0 cm de largura, 6,0 cm de altura e 1 mm de espessura, preparados conforme o seguinte protocolo suficiente para confecção de 2 géis:

a) Gel principal (12 %):

Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.....	2,5 ml
SDS 10 %.....	100 μ l
Bis-acrilamida 30 %.....	4 ml
TEMED.....	8,5 μ l
Persulfato de Amônia 10%.....	100 μ l
Água destilada.....	3,3 ml

b) Gel de concentração (4%):

Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8.....	0,63 ml
SDS 10 % (p/v).....	50 μ l
Bis-acrilamida 30 %.....	0.65 ml
TEMED.....	5 μ l
Persulfato de Amônia 10%.....	25 μ l
Água destilada.....	3,7 ml

As amostras das vesículas enriquecidas de tonoplasto foram homogeneizadas em 20% de tampão da amostra preparado da seguinte maneira:

Tampão da Amostra (5X):

Glicerol 50 % (v/v).....	1 ml
Azul de Bromofenol.....	4 g
β -mercaptoetanol.....	100 μ l
SDS 20 % (p/v).....	900 μ l

A presença de glicerol e bromofenol tem a finalidade de aumentar a densidade e permitir a visualização da frente de corrida, respectivamente. A redução das amostras ocorreu na presença de β -mercaptoetanol. Foram aplicadas aliquotas das amostras contendo 75 μ g de proteína aos poços formados no gel de aplicação.

A eletroforese desenvolveu-se à temperatura de 25 °C com corrente constante de 20 mA por aproximadamente 60 min, em um aparelho de eletroforese Mini Protean II Bio Rad utilizando-se uma fonte regulável de corrente contínua Bio Rad (Power - pac 300) . As

bandas de proteínas foram visualizadas tratando-se o gel com uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,25 % em metanol:ácido acético:água (1:1:12,3).

4.7. Western blot

O immunoblotting ou Western blotting é um método de imunodeteção de uma proteína dentro de uma mistura de proteínas. As proteínas são inicialmente transferidas de um gel de eletroforese para uma membrana e subsequentemente a proteína de interesse é detectada através de uma reação antígeno- anticorpo.

O esquema de montagem do conjunto de transferência é mostrado na Figura 9. No esquema apresentado a transferência foi realizada para uma membrana de nitrocelulose, marca Sigma, com poros de 0,2 μm em uma cuba de eletrotransferência vertical marca Høeffer com um tampão de transferência composta de glicina 39 mM, SDS 0,0375 % (m/v) e metanol 20 % (v/v) em tampão Tris 48 mM pH 7,2, em um volume final de 1500 ml, sob as condições de corrente constante de 200 mA fornecida por uma fonte marca Pharmacia Biotech, modelo EPS-600. O tempo de transferência foi função do número de géis que foram transferidos, sendo necessário 2 h por gel na cuba de transferência. Todo o processo ocorreu em câmara fria, sendo a agitação do tampão de transferência realizada por um agitador magnético.

Após a transferência, a membrana foi imersa numa solução corante de Ponceau a 0,5 % (p:v) 0,5 g do corante de Ponceau, 1,0 ml de ácido acético glacial e 100 ml de água milli-Q q.s.p.) por 10 minutos seguida de lavagem com água destilada para remoção do excesso de corante, quando então era visualizada a presença das proteínas na membrana e marcadas (com caneta esferográfica) a posição do marcadores de peso molecular. Em seguida, a membrana foi incubada, em geladeira, por aproximadamente 18 horas, com

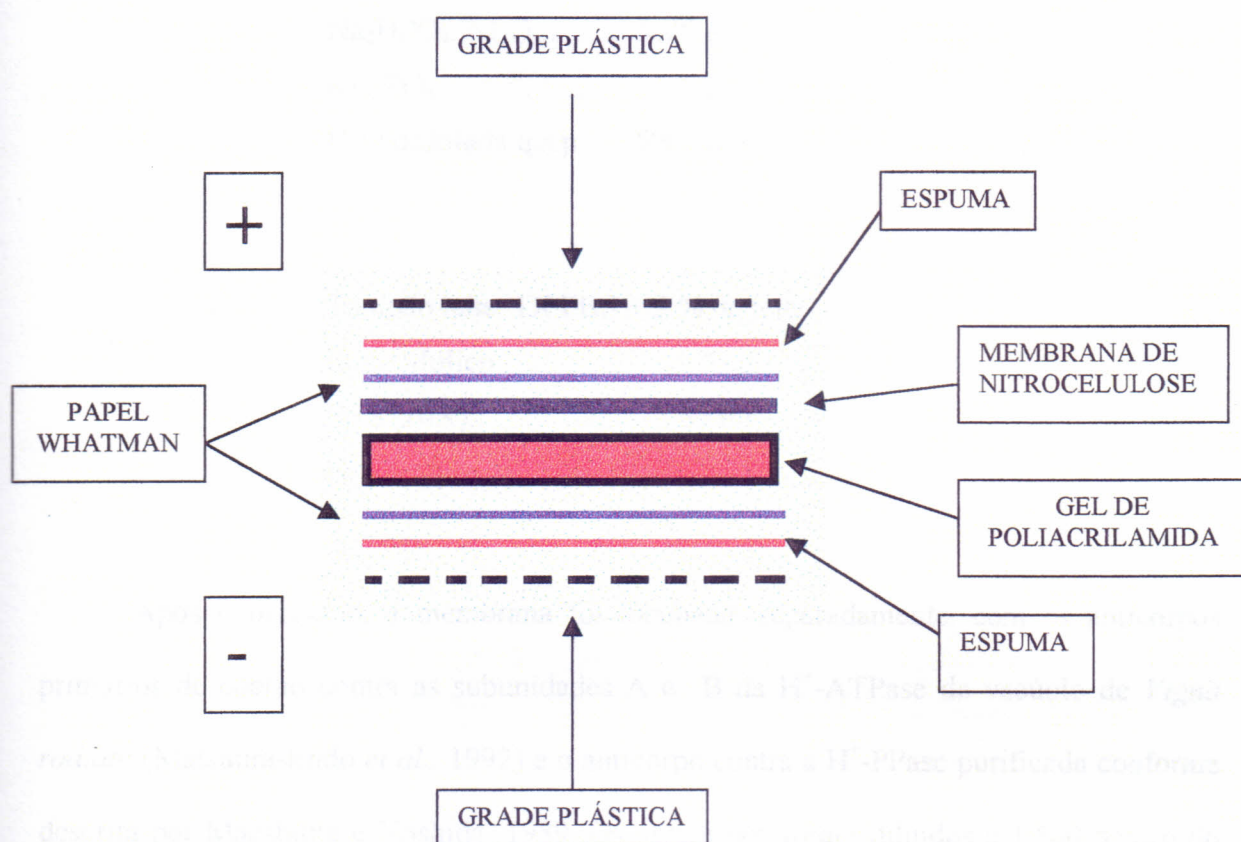


Figura 9. Esquema da sequência de montagem do conjunto para transferência de proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose.

tampão PBS com 5 % de leite desnatado marca Molico (Nestlé), para bloquear os sítios de fixação livres da membrana.

Tampão PBS , pH 6,5 (10X) – Estoque:

NaCl.....40,0 g

KCl.....1,0 g

Na₂HPO₄.7H₂O.....5,75 g

KH₂PO₄.....1 g

H₂O destilada q.s.p.....500 ml

Tampão leite: 1X PBS + 5 % de leite

Leite Molico.....25 g

PBS (10X).....50 ml

H₂O q.s.p.....500 ml

Após o bloqueio, a membrana foi incubada, separadamente, com os anticorpos primários de coelho contra as subunidades A e B da H⁺-ATPase de vacúolo de *Vigna radiata* (Matsuura-Endo *et al.*, 1992) e o anticorpo contra a H⁺-PPase purificada conforme descrita por Maeshima e Yoshida, 1989. Os anticorpos foram diluídos a 1:500 dentro do mesmo tampão com leite durante 1 hora. Após a aplicação do primeiro anticorpo, esse era retirado e a membrana lavada durante 1 hora com o tampão leite, trocando o tampão a cada 15 minutos e invertendo o lado da membrana.

A membrana foi finalmente incubada com o anticorpo secundário (anticorpo desenvolvido contra IgG de coelho (molécula total)). Esse anticorpo era marcado com fosfatase alcalina ou peroxidase. Em ambos os casos, os anticorpos foram diluídos 1:1000 no tampão leite 5 %.

Quando os anticorpos marcados com fosfatase alcalina foram utilizados, os complexos antígeno-anticorpo foram visualizados através da atividade enzimática da fosfatase alcalina, por incubação da membrana em meio de revelação, cuja a composição é descrita a seguir:

Meio de revelação para fosfatase alcalina:

NBT (75 mg/ml).....	30 µl
BCIP (50 mg/ml).....	20 µl
Tampão para fosfatase alcalina.....	10 ml

Tampão para a fosfatase alcalina:

NaCl (2 M).....	5 ml
MgCl ₂ (0,5 M).....	1 ml
Tris/HCl (0,5 M).....	20 ml
H ₂ O destilada q.s.p.....	100 ml

O NBT e o BCIP, insolúveis em água, são previamente solubilizados em 1 ml de dimetilformamida (DMF 70 % (v/v)).

No caso dos anticorpos marcados com peroxidase, a revelação ocorre na presença do seguinte meio de revelação :

Meio de revelação para peroxidase:

DAB (20 mg/ ml).....	100 µl
H ₂ O ₂ 30 % (v/v).....	12 µl
NiCl ₂ (80 mg/ml).....	100 µl
Tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,2 q.s.p.	20 ml

A membrana foi incubada, protegida da luz, no meio de revelação específico para a enzima conjugada ao segundo anticorpo por um período de 5 a 15 minutos, quando a

coloração das bandas apareceram. Para finalizar a revelação, foi adicionada água destilada ao meio, lavando bem até eliminar todo meio de reação. As imagens fotografadas foram analisadas através do programa NIH-Image afim de quantificar o teor proteico. Esse programa leva em consideração a área e a intensidade de cada banda, sob a forma de um parâmetro determinado, a densidade média.

5. RESULTADOS

5.1. Localização das Bombas de Prótons (V-ATPase e H⁺-PPase) nas Distintas Endomembranas.

A distribuição da V-H⁺-ATPase e da H⁺-Pirofosfatase nas distintas endomembranas foi detectada em hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 com 7 dias de semeadura em água destilada.

A Figura 10 mostra a distribuição das atividades de hidrólise e de transporte de prótons da V-ATPase e da H⁺-PPase das membranas de vacúolo, complexo de Golgi e retículo endoplasmático. De acordo com o protocolo seguido, a fração entre os gradientes de sacarose de 12,5% e 20% corresponde às vesículas de tonoplasto. Nessa fração encontramos um pico de atividade de hidrólise da ATPase sensível ao nitrato (V-ATPase) e da pirofosfatase dependente de potássio (H⁺-PPase) que coincidem com os picos das atividades de transporte de prótons das mesmas enzimas. Podemos observar, nessa fração, atividades de hidrólise e de transporte de prótons da V-ATPase superiores 2,3 e 4,5 vezes respectivamente, em relação às atividades da pirofosfatase. A fração, entre os gradientes de sacarose de 20% e 30% que corresponde a uma mistura de membranas de tonoplasto e complexo de Golgi, apresenta um decréscimo de 86% da atividade de hidrólise da ATPase, enquanto que a atividade de hidrólise da H⁺-PPase manteve-se semelhante à atividade pirofosfatásica da fração de vesículas de tonoplasto. A fração correspondente às membranas do complexo de Golgi, entre 30% e 40% de sacarose apresenta uma atividade

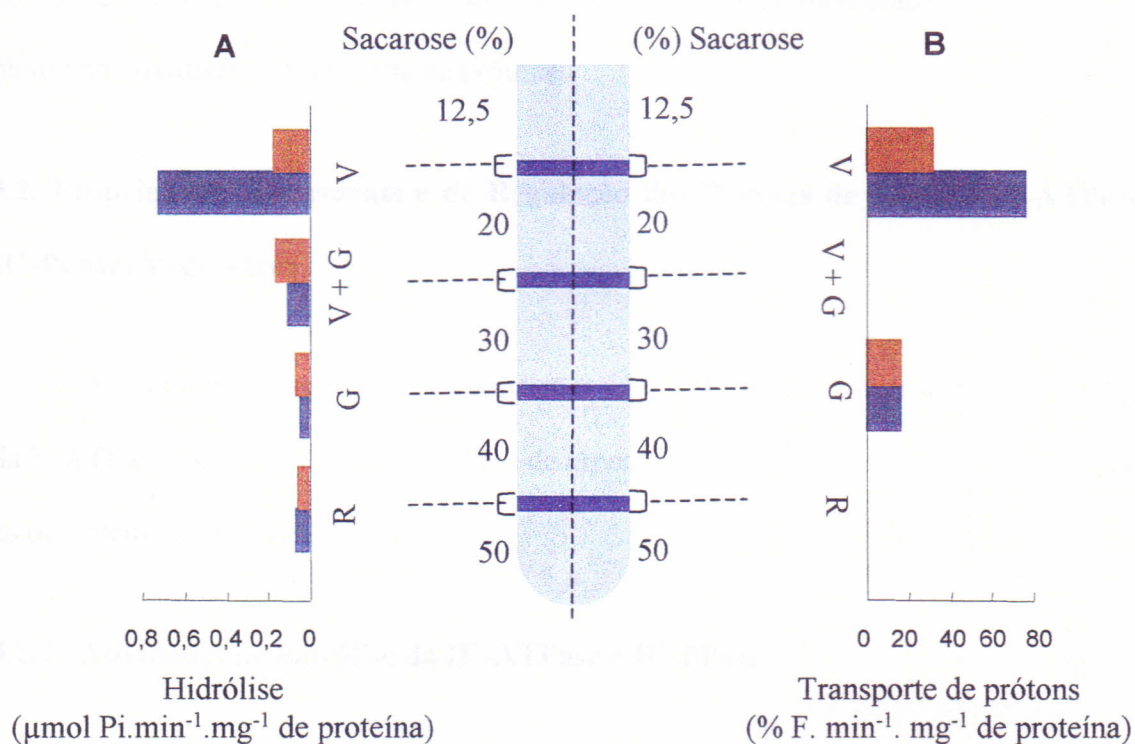


Figura 10. Atividade de hidrólise (A) e de transporte de prótons (B) da V-ATPase (■) e H^+ -PPiase (■) em distintas endomembranas de células de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 após 7 dias de germinação, obtidas por centrifugação diferencial em gradiente de sacarose. V: vacúolo; G:

de hidrólise da H^+ -PPase 1,4 vezes maior que a atividade ATPásica enquanto que, em relação ao transporte de prótons a relação entre as duas enzimas é igual a 1. A fração que compreende as vesículas do retículo endoplasmático, entre 40% e 50% de sacarose, possui baixa atividade de ambas as enzimas, sendo a atividade da ATPase 1,2 vezes maior que a atividade da PPase. Por outro lado, essa fração de endomembranas não apresentou nenhuma atividade de transporte de prótons.

5.2. Propriedades Funcionais e de Regulação das Bombas de Prótons (V-ATPase e H^+ -PPase) Vacuolares

No intuito de estabelecer as condições ideais de ensaio para detectar as atividades da V-ATPase e da H^+ -PPase de vacúolos de hipocótilos de *Vigna unguiculata* investigamos os parâmetros a seguir:

5.2.1. Atividades de hidrólise da H^+ -ATPase e H^+ -PPase

As atividades de hidrólise da V-ATPase e da H^+ -PPase de vacúolos de hipocótilos de *Vigna unguiculata* foram medidas através da determinação do P_i inorgânico liberado na hidrólise dos respectivos substratos, MgATP e MgPPi.

a) Efeito da Temperatura

As vesículas de tonoplasto de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 foram submetidas a diferentes temperaturas (0 à 60°C) e as atividades de hidrólise da V-ATPase e pirofosfatase foram determinadas. A atividade ATPásica cresceu com o aumento da temperatura, apresentando um máximo de atividade à 40°C, quando então, decresceu até 60°C. A atividade pirofosfatásica cresceu com o aumento de temperatura até

60°C. No entanto, a atividade da PPase, até 50°C, apresentou mais baixa do que a atividade ATPásica. Contudo, acima de 50°C, a atividade pirofosfatásica continua aumentando enquanto a atividade ATPásica seguiu em declínio (Figura 11).

b) Efeito do pH

A Figura 12 representa as curvas de atividade ATPásica e PPásica de tonoplasto de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 em função do pH (6,0 a 10,0).

Na Figura 12A observamos um crescimento da atividade ATPásica entre os pHs 6,0 e 7,0, mantendo seu máximo de atividade em torno do pH 7,0 e em seguida apresentando um decréscimo de atividade, que se acentuou entre os valores 8,0 e 9,0, continuando em declínio até o pH 10,0.

A Figura 12B mostra a atividade pirofosfatásica crescente entre os pHs 6,0 e 7,0, com seu ápice em torno do pH 7,0. Em seguida, observamos o início de decréscimo da atividade que continua em declínio até o pH 10.

Comparando-se as Figuras 12A e 12B, observamos que a atividade de hidrólise da ATPase é maior que a atividade PPásica ao longo da faixa de pH estudada.

c) Efeitos de Íons

O efeito de íons nas atividades ATPásica e PPásica foi estudado em vesículas de tonoplasto de hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura.

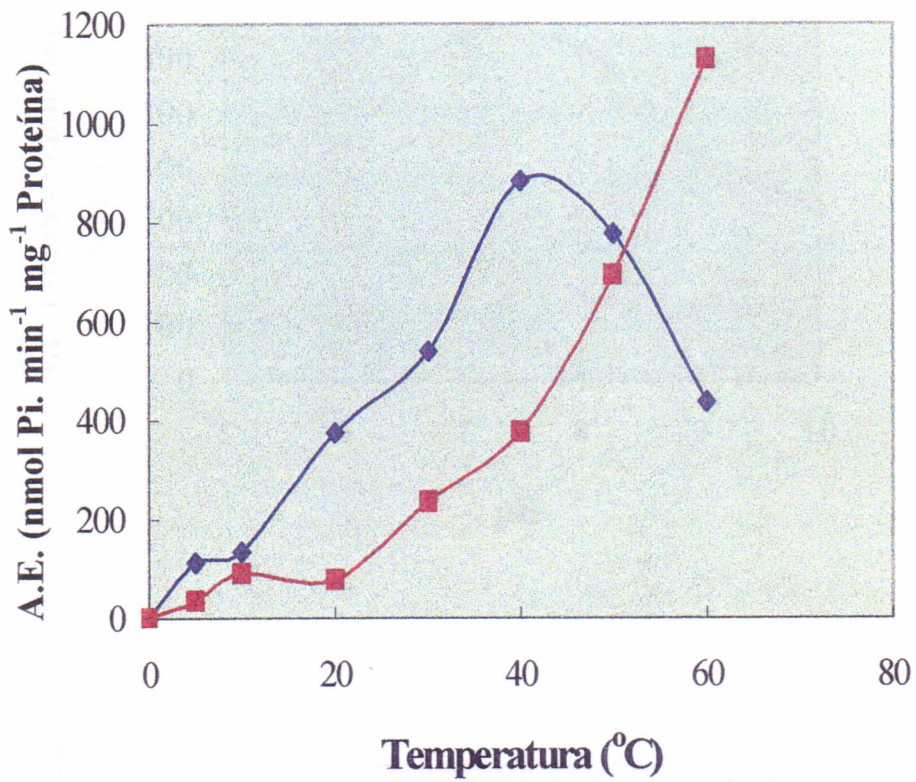


Figura 11. Atividade de hidrólise da (\blacklozenge) V-ATPase e (\blacksquare) H⁺-PPase de vesículas de tonoplasto de hipocótilo de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 em função da temperatura em de plântulas após 7 dias de semeadura em água. A figura mostra um gráfico representativo de três experimentos usando diferentes preparações.

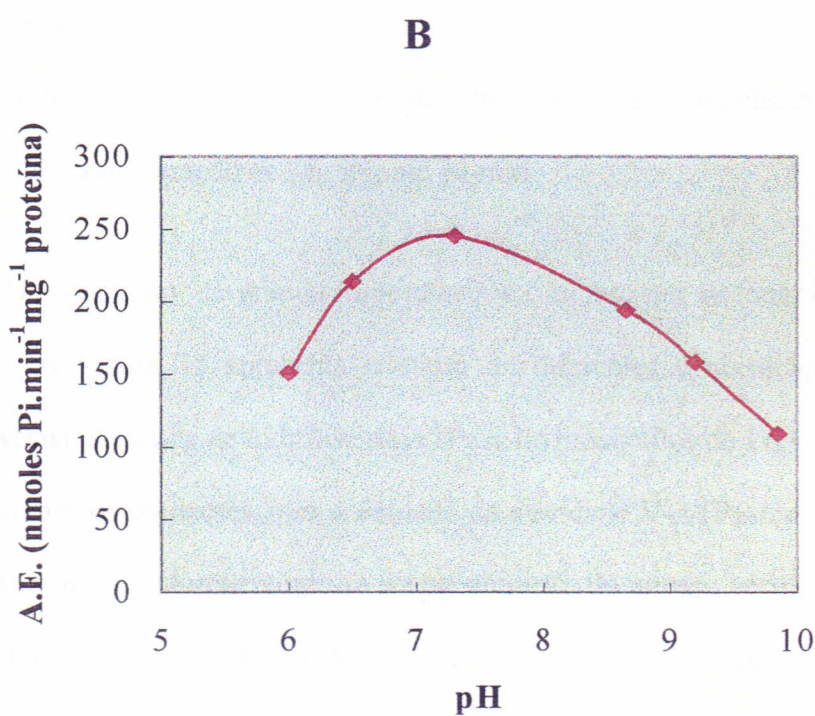
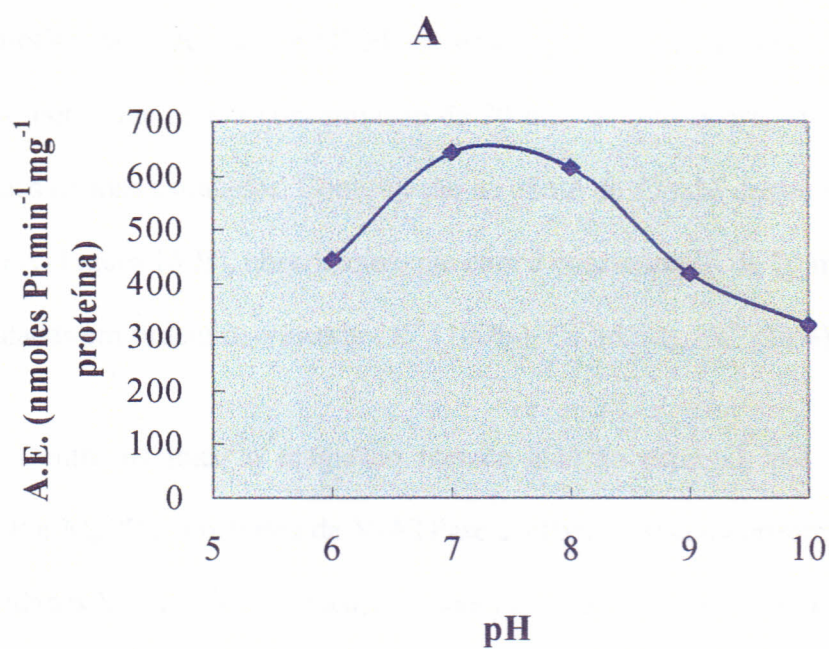


Figura 12. Atividade de hidrólise da (A) V-ATPase e (B) H⁺-PPase de vesículas enriquecidas de tonoplastos de hipocótilos de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura. A figura mostra um gráfico representativo de três experimentos usando diferentes preparações. A.E.: atividade específica.

O efeito de diferentes cátions monovalentes (KCl, CsCl, NaCl, LiCl) na atividade de hidrólise da V-ATPase e H⁺-PPase está representada na Figura 13. Na Figura 13A, pode-se notar que com a concentração de 70 mM de íons ocorre um estímulo semelhante por todos os íons estudados. Com relação ao efeito de 70 mM desses íons sobre a hidrólise da PPase (Figura 13 B), observamos que com a concentração de 70 mM, as atividades são estimuladas em ordem decrescente: K⁺ (100%), Cs⁺ (62%), Na⁺ (20%), Li⁺ (19%).

Dentre os íons, o magnésio merece atenção especial, por compor o complexo MgATP e MgPPi, substratos da V-ATPase e PPase, respectivamente. A Figura 14 mostra as atividades V-ATPásica e PPásica de tonoplasto de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 em função de diferentes concentrações de MgSO₄. Observa-se que as atividades de hidrólise para ambas as enzimas, detectadas com a presença de ATP 1 mM, apresentam um aumento acentuado até 1 mM de MgSO₄, mantendo-se constante com o aumento da concentração de MgSO₄ até 10 mM.

Um outro íon de grande importância é o nitrato por se tratar de um inibidor da V-ATPase. A Figura 15 apresenta o efeito de diferentes concentrações de nitrato (50 a 300 mM) na atividade de hidrólise da ATPase de hipocótilos de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5. Observamos um decréscimo acentuado da atividade V-ATPásica até a concentração de 50 mM de nitrato. Aumentando-se a concentração de nitrato, verificamos que a atividade atinge um máximo de inibição com 100 mM, mantendo-se constante até 300 mM.

d) Propriedades Cinéticas (Km e Vmáx)

As propriedades cinéticas da ATPase e da PPase foram estudadas em vesículas de tonoplasto de hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 após 7 dias de germinação.

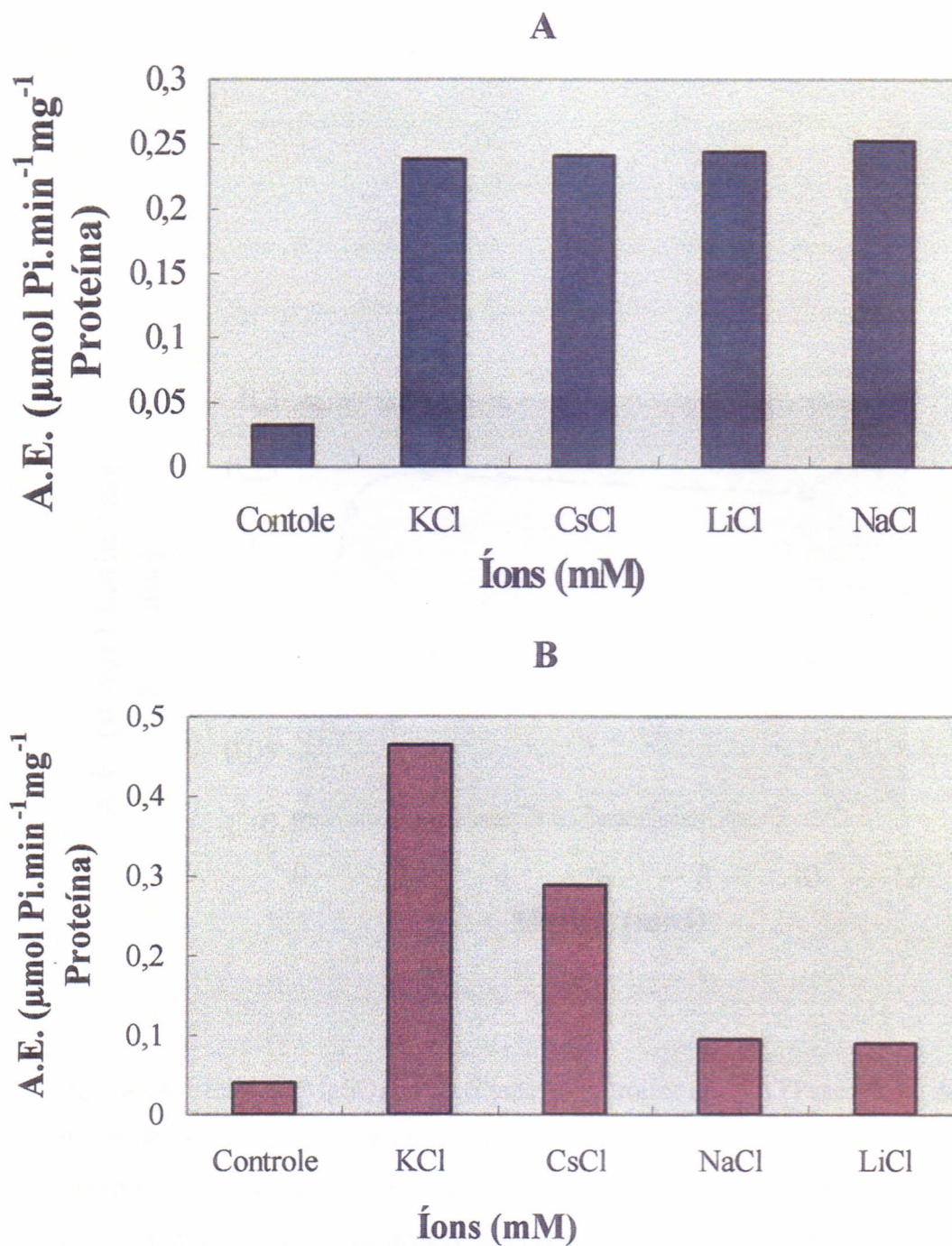


Figura 13. Efeito de íons (70 mM) na atividade de hidrólise da V-ATPase (A) e da PPase (B) de hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Vita 5. A figura mostra um gráfico representativo de três repetições.

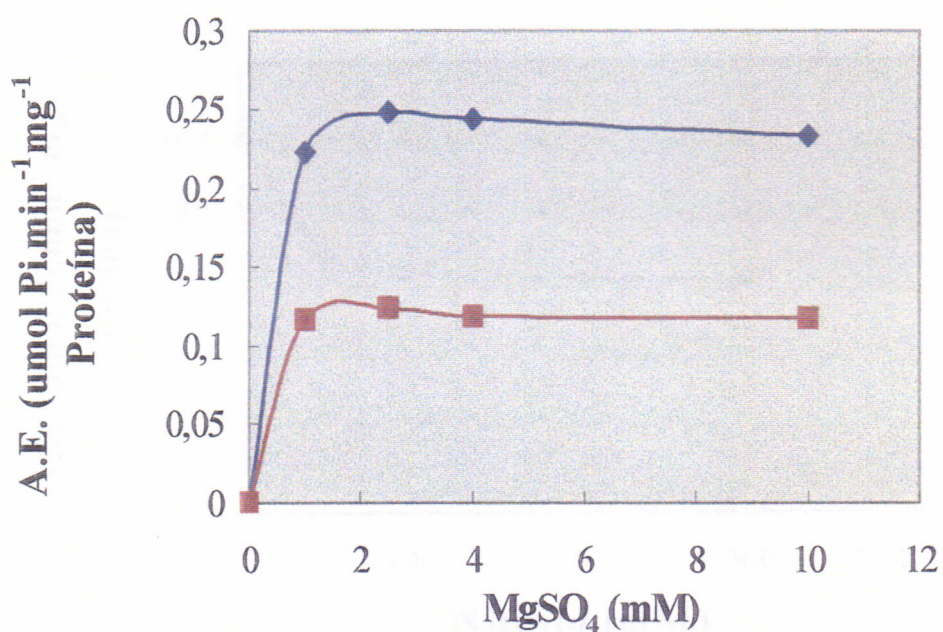


Figura 14. Efeito do MgSO_4 na atividade de hidrólise da V-ATPase (◆) e da H^+ -PPase (■) de vesículas de tonoplasto de hipocótilo de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 germinada em condições controle durante 7 dias. A figura mostra um gráfico representativo de três experimentos usando diferentes preparações.

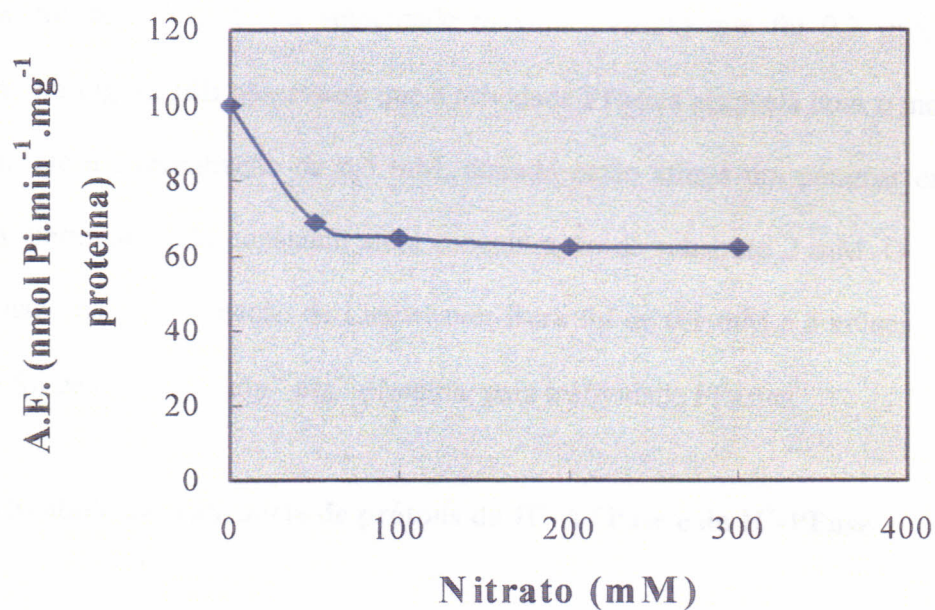


Figura 15. Efeito do nitrato na atividade de hidrólise da ATPase de vesículas de tonoplasto de hipocótilo de plântulas de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 germinadas em água durante 7 dias. A figura mostra um gráfico representativo de três experimentos usando diferentes preparações.

Nas Figuras 16A e 16B são apresentadas as atividades ATPásica e PPásica em função de diferentes concentrações de substrato. Observa-se que as curvas obedecem à cinética de Michaelis-Menten. A Figura 16A mostra que a atividade ATPásica cresce com o aumento da concentração de substrato até 1 mM. A partir desse valor, a atividade ATPásica atinge seu valor máximo permanecendo, praticamente, constante até a concentração de 2 mM. Através do gráfico de Lineweaver-Burk determinou-se o valor de K_m que foi de 0,2 mM e a velocidade máxima (V_{max}) que foi $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína. Na Figura 16B observa-se que a atividade PPásica aumenta com o incremento do substrato até à concentração de 0,5 mM, quando então atinge um patamar em atividade máxima, permanecendo constante até a concentração de substrato 2 mM. O valor de K_m determinado na representação de Lineweaver-Burk foi de 0,1 mM e a velocidade máxima (V_{max}) foi de $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína, para a atividade PPásica

5.2.2. Atividade de transporte de prótons da H^+ -ATPase e da H^+ -PPase

As medidas de fluorescência revelam o ΔpH que, por sua vez reflete a atividade de transporte das bombas de prótons. Quanto maior a supressão da fluorescência maior a velocidade do transporte de prótons. Quando ocorre supressão de fluorescência, após a adição de ATP ou PPi , isso indica que está havendo transporte de prótons para o interior da vesícula, protonando o ACMA, aumentando o ΔpH . As atividades de transporte de prótons da ATPase e a da PPase nas vesículas de tonoplasto foram determinadas através dos parâmetros a seguir:

a) Efeito da Temperatura

O efeito da temperatura (0 à 60°C) na atividade de transporte de prótons da V-ATPase e pirofosfatase de hipocótilo de plântulas de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 após 7

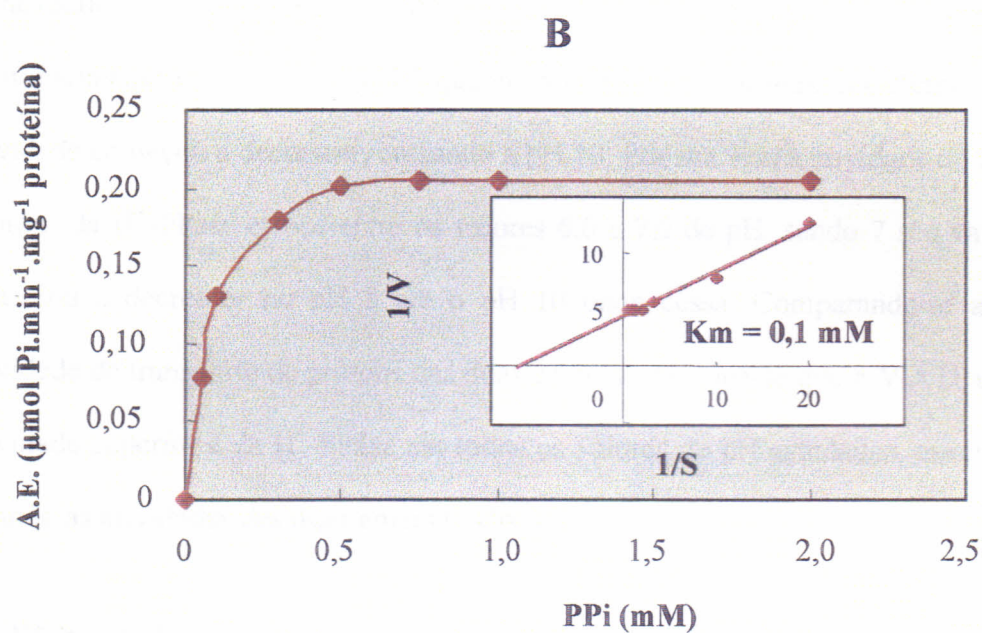
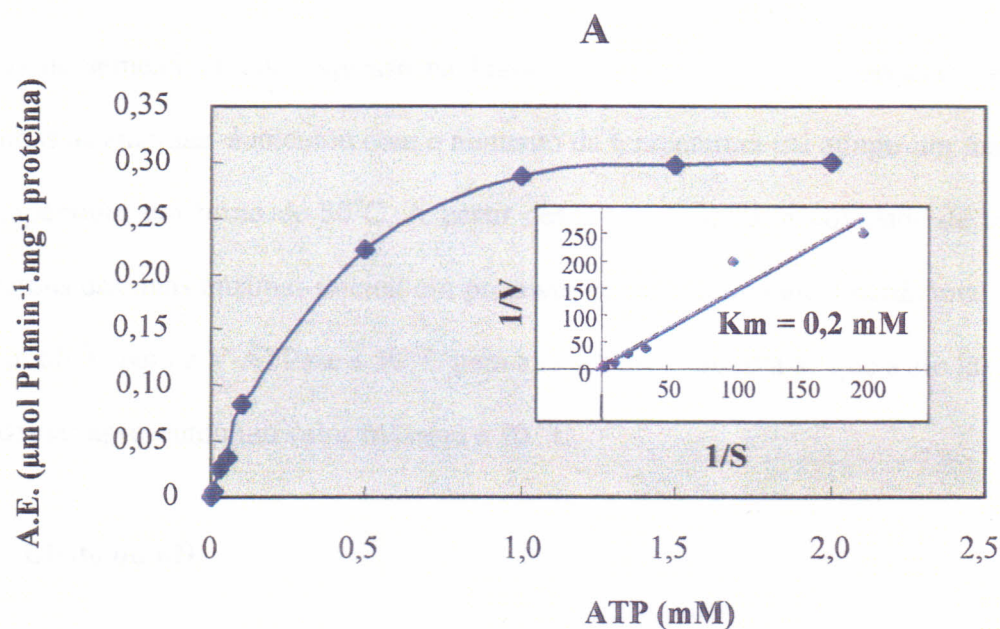


Figura 16. Efeito da concentração de ATP na atividade de hidrólise da V-ATPase (A) e da concentração de PPi na atividade de hidrólise da H^+ -PPase (B) de vesículas de tonoplástos de hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 após 7 dias de germinação. Nos insertos estão as representações gráficas de Lineweaver-Burk. AE = Atividade Específica.

dias de semeadura está expresso na Figura 17. A atividade de transporte de prótons de ambas as enzimas aumentou com o aumento da temperatura até atingir um máximo com a temperatura em torno de 30°C. A partir dessa temperatura, a atividade de transporte de prótons das duas enzimas iniciou um processo de decréscimo até a perda total de atividade com 60 °C para a V-ATPase e 50 °C para a H⁺-PPase. Observa-se que a atividade de ambas enzimas apresentou um valor máximo a 30 °C.

b) Efeito do pH

A Figura 18 apresenta a atividade de transporte de prótons da V-ATPase e da PPase de tonoplastos de hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura, em função do pH. A atividade de transporte de prótons da V-ATPase cresceu com o aumento do pH, de 6,0 a 8,0 quando atingiu seu valor máximo. Acima do pH 8,0, a atividade começou a decrescer, cessando a pH 10. Por sua vez, a atividade de transporte de prótons da H⁺-PPase cresce entre os valores 6,0 e 7,0 de pH, sendo 7 seu valor máximo; começou a decrescer no pH 8 até o pH 10 onde cessa. Comparando-se as curvas de atividade de transporte de prótons das duas enzimas, verifica-se que a V-ATPase apresenta atividade superior à da H⁺-PPase em todos os valores de pH estudados, exceto em pH 10 quando as atividades das duas enzimas são iguais a zero.

c) Efeitos de Íons

A Figura 19 (A) e (B) mostra o efeito de cátions monovalentes, sobre a atividade de transporte de prótons da V-ATPase e da H⁺-PPase de plântulas de *Vigna unguiculata* cv Vita 5 após 7 dias de germinação. Na Figura 19 (A) observa-se que os cátions monovalentes apresentam um efeito estimulador do transporte de prótons, até uma concentração em torno de 100 mM. A partir dessa concentração nota-se que as atividades

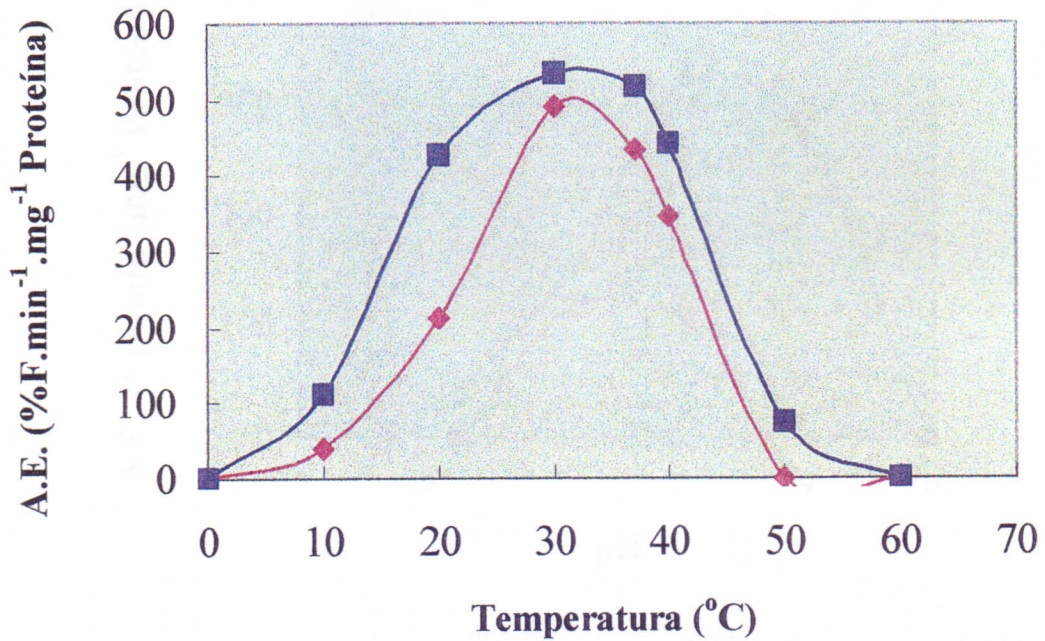


Figura 17. Efeito da temperatura na atividade de transporte de prótons da V-ATPase (■) e da H⁺-PPase (◆) em vesículas vacuolares de hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 com 7 dias após a semeadura. A.E.: atividade específica.

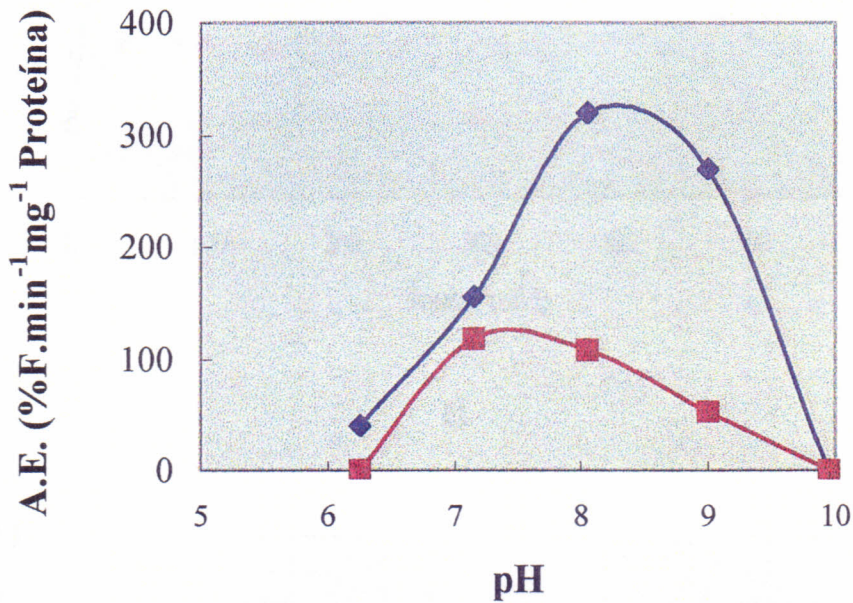


Figura 18. Efeito do pH na atividade de transporte de prótons da V-ATPase (◆) e da H⁺-PPase (■) de tonoplasto de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5 após 7 dias de germinação. A. E. = Atividade específica.

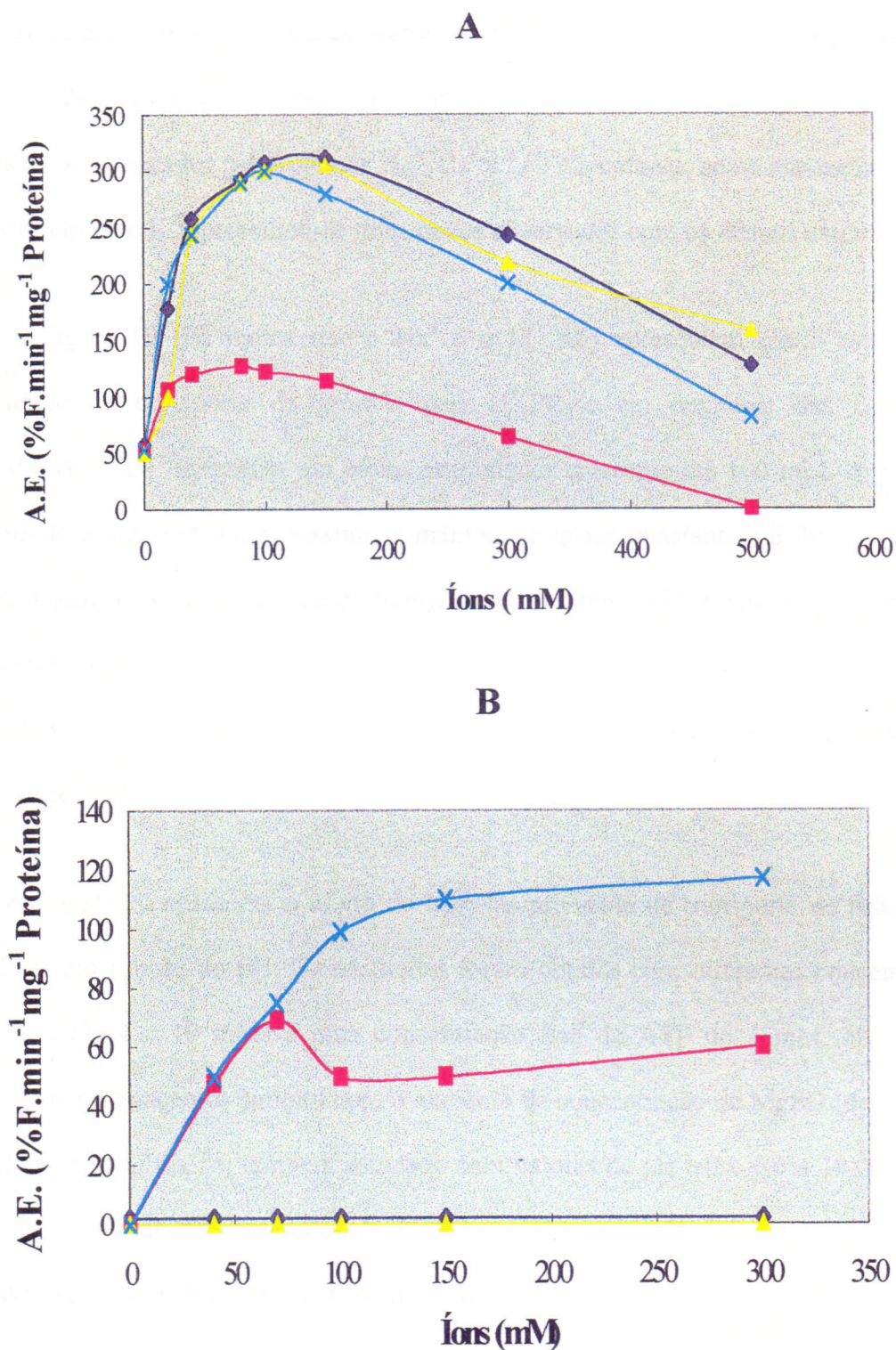


Figura 19. Efeito de diferentes íons (Na^+ : ◆ , K^+ : ■ , Li^+ : ▲ e Cs^+ : ×) sobre as atividades de transporte de prótons da V-ATPase (A) e da H^+ -PPase (B) de tonoplastos de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita 5, após 7 dias de germinação. AE = Atividade Específica.

começam a decrescer até a concentração máxima de 500 mM. Com uma concentração de 70 mM de cátions monovalentes não foram observadas diferenças significativas entre os estímulos provocados pelos cátions Na^+ , Cs^+ e Li^+ . No entanto, nessa mesma concentração, o estímulo pelo K^+ apresentou-se inferior aos observados com os demais cátions.

A Figura 19 (B) indica que o Na^+ e o Li^+ não apresentam efeito estimulador na atividade de transporte de prótons pela H^+ -PPase em nenhuma das concentrações estudadas. O Cs^+ apresenta um efeito estimulador crescente até 100 mM. A partir daí, a atividade atinge um valor máximo e mantém-se quase constante até 300 mM. O efeito estimulador do K^+ na atividade de transporte de prótons da H^+ -PPase aumenta até 70 mM atingindo, nessa concentração, o seu valor máximo. A partir dessa concentração ótima a atividade sofre um decréscimo até 100 mM, quando então permanece praticamente constante até 300 mM.

A Figura 20 apresenta o efeito do Mg^{2+} na atividade de transporte de prótons da V-ATPase em função do pH. Os resultados foram obtidos com diferentes concentrações de Mg_2SO_4 (1, 4 e 10 mM) e uma concentração fixa de ATP de 1 mM. Nota-se que a atividade de transporte diminui com o aumento da concentração de MgSO_4 de 1 a 10 mM. O efeito do MgSO_4 foi também estudado com valores de pH entre 6,0 e 10,0. Observa-se que, para as três concentrações de MgSO_4 estudadas, o pH ótimo para a atividade de transporte da V-ATPase ficou em torno de 8.

A Figura 21 apresenta o efeito de diferentes concentrações de MgSO_4 (1, 2 e 3 mM) no transporte de prótons da H^+ -PPase com uma concentração fixa de PPI, de 0,1 mM em pH 7,0. Observa-se que o aumento da atividade de transporte é inversamente proporcional à concentração de magnésio, nos valores estudados.

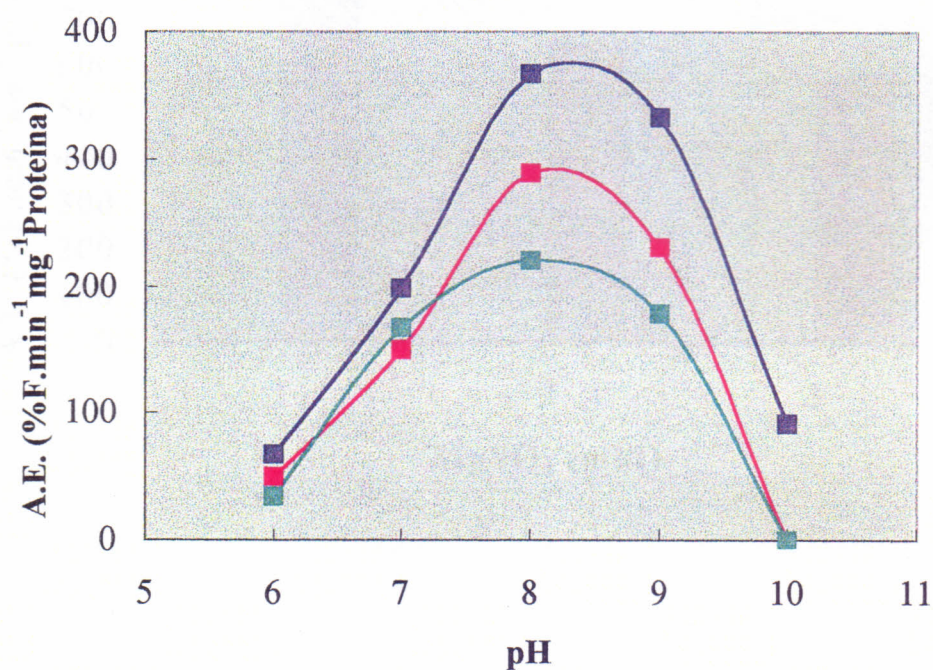


Figura 20. Efeito do Magnésio na atividade de transporte de prótons da V-ATPase de vesículas de tonoplastos em hipocótilos de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 germinada em condições controle durante 7 dias. Foram aplicadas diferentes concentrações de MgSO₄: (■) 1 mM, (■) 4 mM e (■) 10 mM com uma concentração fixa de 1 mM de ATP em função do pH. A figura mostra um gráfico representativo de três experimentos usando diferentes preparações. AE = Atividade Específica.

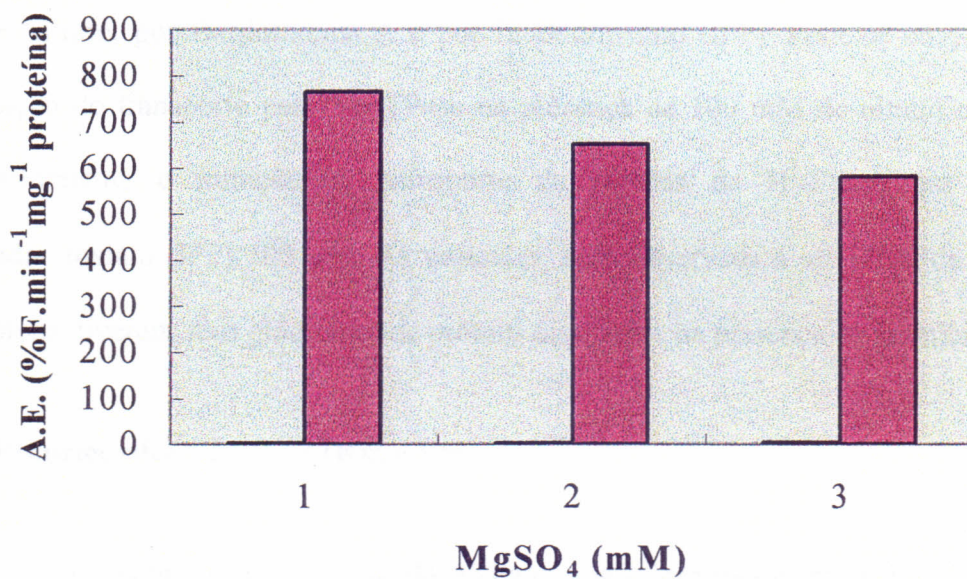


Figura 21. Efeito do Magnésio na atividade de transporte de prótons da H^+ -PPase de vesículas de tonoplasto de hipocótilo de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 germinada em condições controle durante 7 dias. Foram aplicadas diferentes concentrações de $MgSO_4$ com uma concentração fixa de 0,1 mM de PPI. A figura mostra um gráfico representativo de três experimentos usando diferentes preparações. AE = Atividade Específica.

e) Efeito de Inibidores do Transporte de Prótons pela H^+ -ATPase e pela H^+ -PPase

A Figura 22 mostra a inibição do transporte de prótons da V-ATPase e da H^+ -PPase por Nitrato, por Bafilomicina A e por Imidodifosfato (IPP). Pode-se observar 100% de inibição do transporte pela V-ATPase na presença de 100 mM de nitrato e de 4 nM de Bafilomicina e inibição do transporte de prótons da H^+ -PPase em presença de imidodifosfato (IPP) 100 μ M. As vesículas, após observada a atividade de transporte de prótons, tiveram seus gradientes de prótons dissipados na presença de gramicidina.

f) Propriedades Cinéticas (K_m e $V_{m\acute{a}x}$)

As propriedades cinéticas da ATPase e da PPase foram estudadas em vesículas de tonoplasto de hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura (Figura 23) (A) e (B). Nessa Figura são mostradas as atividades de transporte de prótons da V-ATPase e H^+ -PPase em função de diferentes concentrações de substrato. Observa-se que as curvas obedecem à cinética de Michaelis-Menten. A figura 23 (A) mostra que a atividade de transporte da ATPase cresce com o aumento de substrato até a concentração de 1 mM. A partir desse valor, a atividade ATPásica atinge um patamar permanecendo constante até 2 mM. Através do gráfico de Lineweaver Burk determinamos o valor de K_m que foi de 0,6 mM e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) que foi 240 %F.min⁻¹.mg⁻¹ proteína. A Figura 23 B mostra que a atividade PPásica cresce com o aumento do substrato até a concentração de 0,03 mM, quando então atinge um patamar de atividade máxima, permanecendo constante até a concentração 0,01 mM. O valor de K_m determinado na representação de Lineweaver-Burk foi de 0,03 mM e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) foi de 110 %F.min⁻¹.mg⁻¹ proteína.

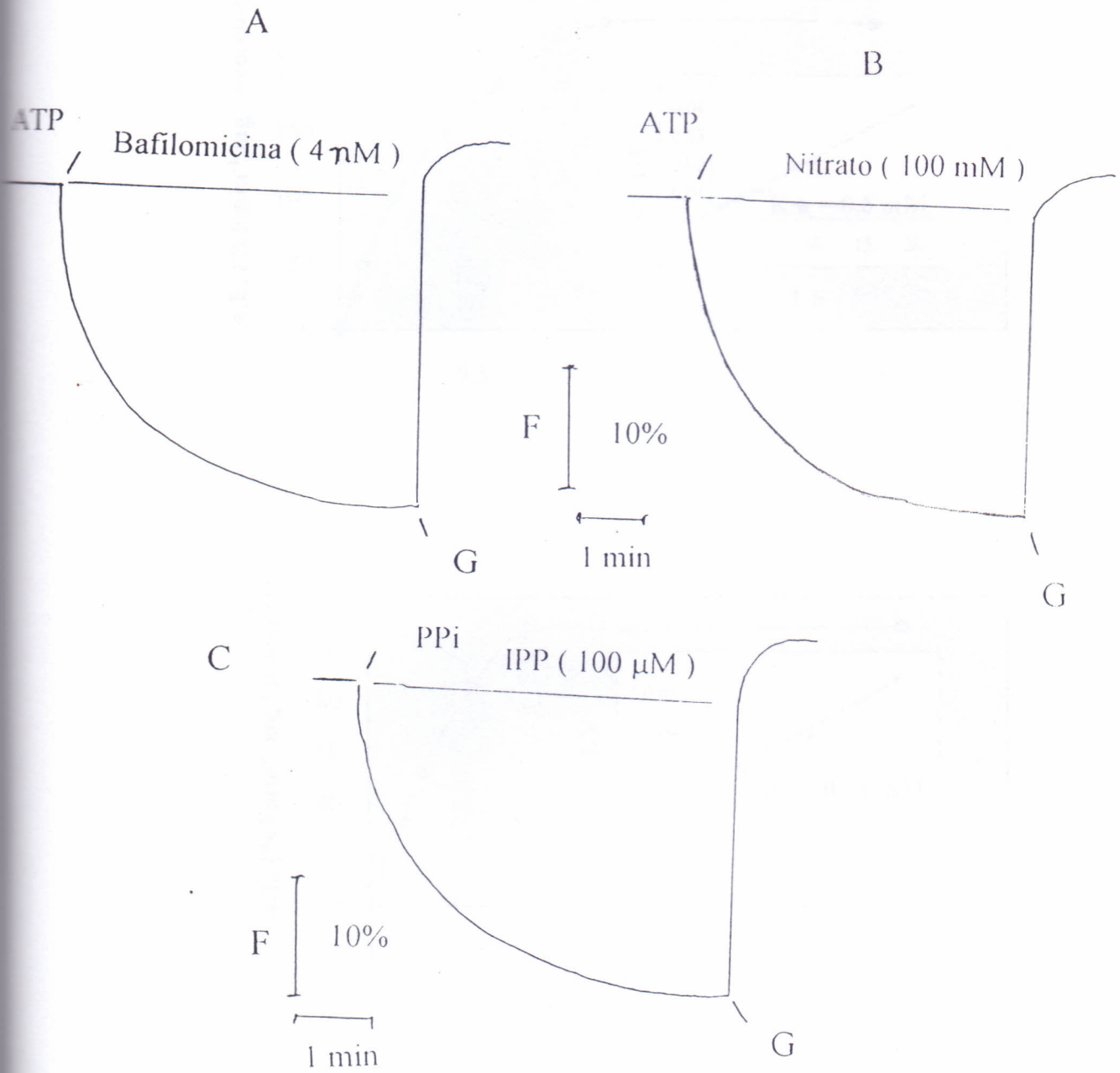


Figura 22. Efeito de inibidores (A) bafilomicina A, (B) nitrato na atividade de transporte de prótons da V-ATPase e do inibidor (C) imidodifosfato na atividade de transporte de H^+ -PPase de tonoplastos de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5. G = 2,5 μ g/ml de gramicidina.

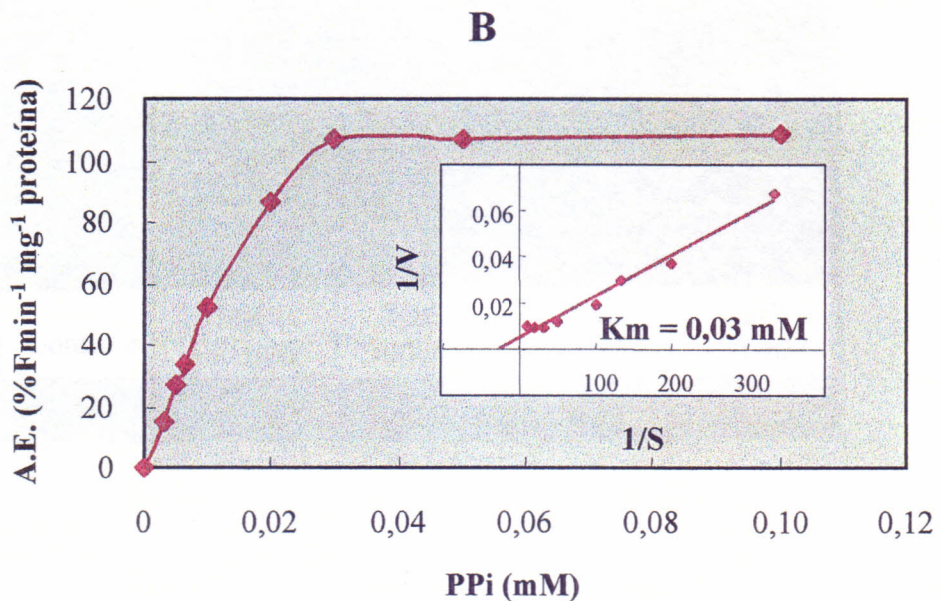
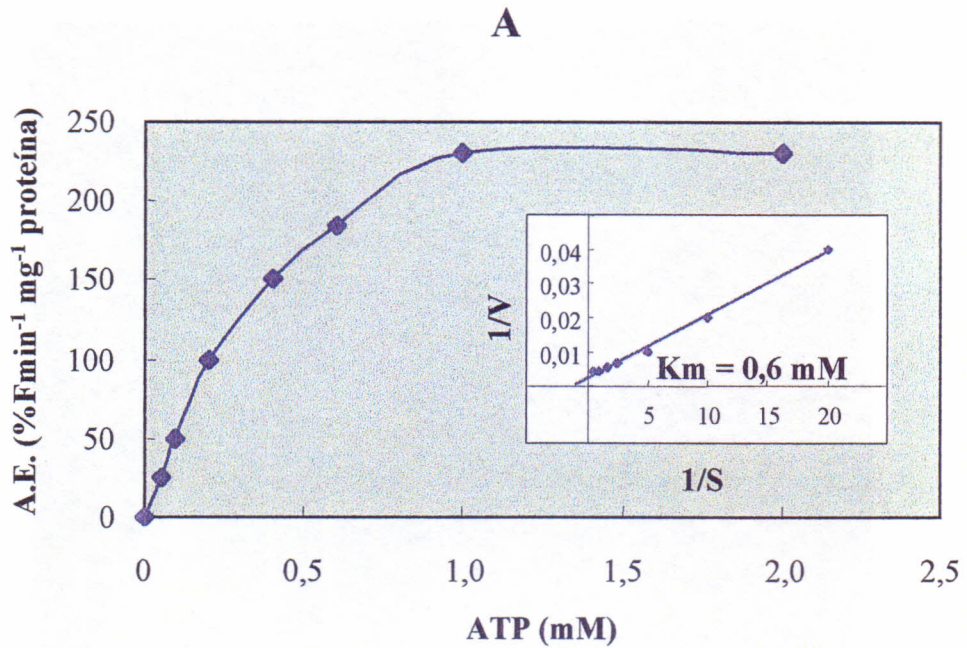


Figura 23. Efeito da concentração de ATP na atividade de transporte de prótons da V-ATPase (A) e da concentração de PPI na atividade de transporte de prótons da H⁺-PPase (B) de vesículas de tonoplastos de hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 após 7 dias de germinação. Nos insertos estão as representações gráficas de Lineweaver-Burk. AE = Atividade Específica.



Figura 24. Plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 (esquerda) e cv. Vita 3 (direita) em condições controle e de diferentes concentrações de NaCl, após 7 dias de semeadura.



Figura 25. Plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Vita 3 crescidas em condições controle e em presença de NaCl 100 mM, após 3 e 7 dias de semeadura.



Figura 26. Plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Vita 5 crescidas em condições controle e em presença de NaCl 100 mM, após 3 e 7 dias de semeadura.

5.3. Parâmetros Indicativos do Estresse Salino em dois Cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (Vita 3 e Vita 5) com Diferentes Graus de Tolerância ao NaCl.

Os parâmetros apresentados a seguir foram utilizados para avaliar os efeitos do NaCl sobre as plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

5.3.1. Análise Visual dos Efeitos de Concentrações Crescentes de NaCl Sobre a o Crescimento de Plântulas de *Vigna unguiculata*

Visando determinar uma concentração de NaCl capaz de induzir uma situação de estresse com repercussão sobre o crescimento das plântulas de *Vigna unguiculata*, sementes dos dois cultivares, Vita 3 e Vita 5 em diferentes concentrações de NaCl (50, 100, 150 e 200 mM) e em condições-controle foram postas a germinar. Na Figura 24, pode-se notar que a germinação na presença de 50 mM de NaCl não apresentou efeitos significativos sobre o desenvolvimento da plântula. No entanto, as plântulas tiveram seu crescimento reduzido em aproximadamente 40 % com o tratamento de NaCl 100 mM e em mais de 90%, na presença de NaCl 200 mM. Todas as medidas foram feitas ao fim de 7 dias de germinação.

5.3.2. Análise Visual dos Efeitos da Salinidade em dois Tempos após a Semeadura

A concentração de 100 mM de NaCl, foi escolhida para o acompanhamento visual dos efeitos causados pelo estresse nos cultivares Vita 3 (Figura 25) e Vita 5 (Figura 26) ao longo do tempo. Nas Figuras 25 e 26 pode-se observar as plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 3 e Vita 5 durante 3 e 7 dias após a semeadura em ausência e presença de NaCl 100 mM. Pode-se observar que, mesmo com 7 dias de semeadura os cotilédones permanecem ligados às plântulas.

5.3.3. Medidas de Crescimento e Relação Raiz/Parte Aérea

O efeito do NaCl sobre o crescimento das plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) WALP. foi estudado através da determinação das medidas de comprimento das raízes e das partes aéreas das mesmas, bem como através da determinação dos pesos frescos e secos após 3 e 7 dias de germinação das sementes. Como foi mencionado anteriormente, a concentração de NaCl foi de 100 mM e as plantas-controle foram semeadas em água destilada.

5.3.3.1. Determinação da Relação Raiz/Parte Aérea

Na Tabela 4 são apresentados os valores dos comprimento do sistema radicular, do hipocótilo e da parte aérea das plântulas nos diferentes tratamentos e a relação raiz/parte aérea das mesmas. Pode-se observar que houve um aumento da relação raiz/parte aérea das plântulas germinadas na presença de NaCl 100 mM, sendo que a relação raiz/parte aérea das plântulas de Vita 3 apresentou um valor superior ao encontrado nas plântulas de Vita 5. Pode-se observar que, com 3 dias de germinação na presença de NaCl 100 mM, a raiz e o hipocótilo de Vita 3 sofreram uma redução de crescimento de 33% e 56%, respectivamente, enquanto que em Vita 5 essa redução foi de 18% e de 49%, respectivamente. Com 7 dias de semeadura, ocorreu um aumento no crescimento da raiz em presença de NaCl 100 mM de 19 % e 7 % em Vita 3 e Vita 5, respectivamente. No entanto, no hipocótilo de Vita 3 ocorreu uma diminuição do crescimento de 52 % em presença de NaCl 100 mM e não foi observada diferença significativa no tamanho do hipocótilo de Vita 5 em presença de NaCl 100 mM.

Cultivar	Tratamento	Parte Aérea (cm)	Hipocótilo (cm)	Raiz (cm)	Raiz/Parte Aérea
V3	C – 3d	2,81 ±1,27	2,81 ±1,27	9,18±2,63	3,27
	C – 7d	19,81±3,97	10,99±1,50	12,13±2,13	0,61
	S – 3d	1,23±0,50	1,23±0,50	6,17±0,89	5,02
	S – 7d	5,33±1,11	5,33±1,11	14,41±1,65	2,70
V5	C – 3d	6,27±1,58	6,54±0,36	3,85±1,24	0,61
	C – 7d	20,99±3,03	6,54±0,79	5,66±2,06	0,27
	S – 3d	3,35±0,71	3,35±0,71	3,17±0,99	0,95
	S – 7d	9,49±2,96	6,51±0,76	6,04±2,64	0,64

Tabela 4. Parâmetros de crescimento de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) WALP. cv. Vita 3 e Vita 5 após 3 e 7 dias de semeadura no controle e em presença de NaCl 100 mM.

5.3.3.2. Crescimento das Raízes

A Figura 27 mostra o crescimento da raiz de plântulas de Vita 3 e Vita 5 semeadas durante 3 e 7 dias, na presença e ausência de 100 mM de NaCl. Pode-se observar que a taxa de crescimento da raiz de Vita 5 no estresse salino é semelhante à taxa de crescimento da raiz no controle. No entanto, observa-se um aumento na taxa de crescimento da raiz de Vita 3, na presença de NaCl 100 mM.

5.3.3.4. Determinação do incremento da relação raiz/parte aérea

Comparando o incremento da relação raiz/parte aérea com 3 e 7 dias de semeadura, no controle e em presença de NaCl 100 mM, observa-se que, com os cultivares Vita 3 e Vita 5, na presença de NaCl ocorre um aumento de 1,5 vezes em relação ao controle. No entanto, esse incremento apresenta valores diferentes para os dois cultivares, após 7 dias de germinação, onde ela passa para 4,4 vezes em relação ao controle no cultivar Vita 3 e 2,3 vezes, também em relação ao controle, no cultivar Vita 5 (Figura 28). O aumento no incremento da relação raiz/parte aérea é 90% maior em Vita 3 do que em Vita 5 ao cabo de 7 dias de semeadura.

5.3.3.5. Determinação das Massas Seca e Fresca e do Teor de Água das Plântulas, dos Hipocótilos e das Raízes

Nas tabelas 5 e 6 são apresentados os valores dos pesos frescos do sistema radicular, da parte aérea e do hipocótilo de plântulas de Vita 3 (Tabela 5) e de Vita 5 (Tabela 6) com 3 e 7 dia de germinação, em presença e ausência de 100 mM de NaCl. Na tabela V, com relação ao peso fresco do sistema radicular, observa-se uma diminuição de 35% do peso fresco em presença de NaCl 100 mM, enquanto que com 7 dias não foi observado

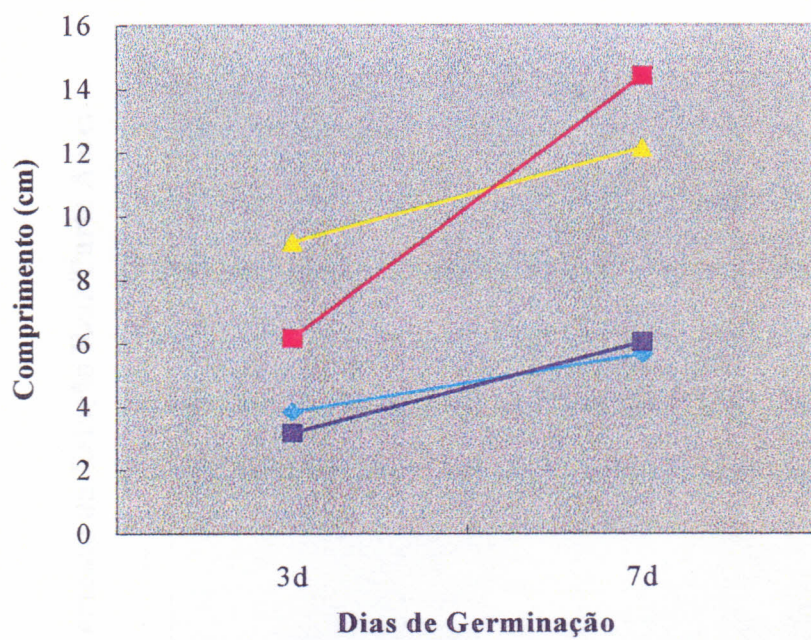


Figura 27. Comprimento das raízes de Vita 5 em condições controle (◆) e em presença de NaCl 100 mM (■) das raízes de Vita 3 em condições controle (▲) e em presença de NaCl 100 mM (■).

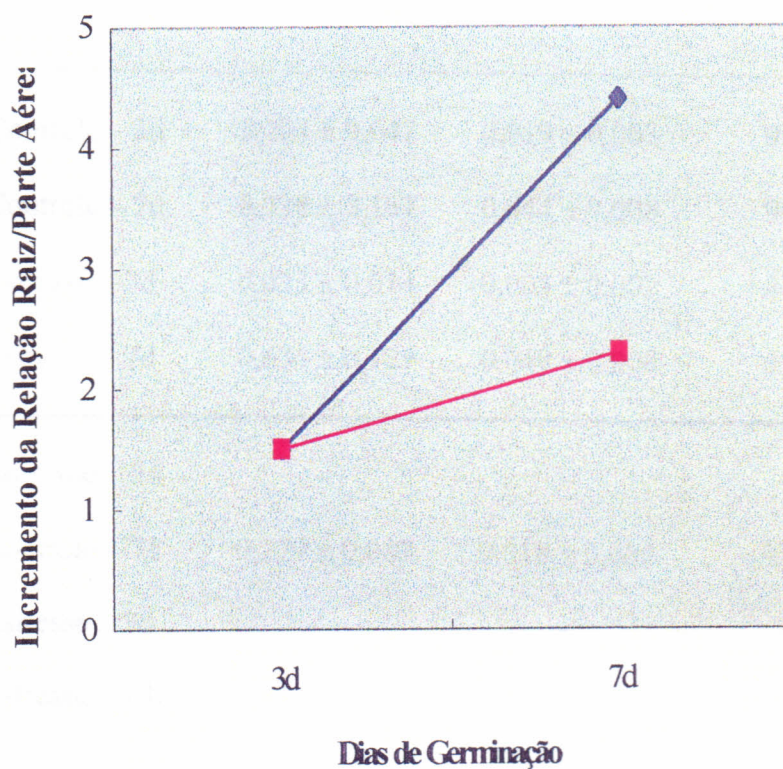


Figura 28. Incremento da relação raiz/parte aérea de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Vita 3 (◆) e Vita 5 (■) após 3 e 7 dias de semeadura em presença de NaCl 100 mM.

	Tratamento	Matéria Fresca (g)	Matéria Seca (g)	Teor de água (%)
Sistema Radicular	Controle – 3d	0,095 ± 0,028	0,005 ± 0,001	94,7
	Controle – 7d	0,247 ± 0,017	0,011 ± 0,001	99,5
	Estresse – 3d	0,062 ± 0,016	0,005 ± 0,002	92,0
	Estresse – 7d	0,249 ± 0,028	0,012 ± 0,001	95,2
Hipocótilo	Controle – 3d	0,205 ± 0,047	0,019 ± 0,003	91,0
	Controle – 7d	0,728 ± 0,137	0,044 ± 0,008	94,0
	Estresse – 3d	0,033 ± 0,014	0,005 ± 0,002	84,8
	Estresse – 7d	0,636 ± 0,127	0,048 ± 0,008	92,5
Plântula	Controle – 3d	-	-	-
	Controle – 7d	0,279 ± 0,087	0,018 ± 0,005	95,0
	Estresse – 3d	-	-	-
	Estresse – 7d	-	-	-
Folha	Controle – 3d	-	-	-
	Controle – 7d	0,036 ± 0,007	0,006 ± 0,001	93,3
	Estresse – 3d	-	-	-
	Estresse – 7d	0,029 ± 0,005	0,004 ± 0,001	86,2

Tabela 5. Matéria fresca, matéria seca e teor de água da raiz, hipocótilo, epicótilo e folha de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Vita 3 após 3 e 7 dias de semeadura em condições controle e em presença de NaCl 100 mM.

	Tratamento	Matéria Fresca (g)	Matéria Seca (g)	Teor de água (%)
Sistema Radicular	Controle – 3d	0,105 ± 0,014	0,007 ± 0,001	93,3
	Controle – 7d	0,139 ± 0,026	0,010 ± 0,001	92,8
	Estresse – 3d	0,069 ± 0,014	0,005 ± 0,001	92,8
	Estresse – 7d	0,137 ± 0,026	0,009 ± 0,001	93,4
Hipocótilo	Controle – 3d	0,230 ± 0,063	0,018 ± 0,002	92,2
	Controle – 7d	0,299 ± 0,059	0,022 ± 0,004	92,6
	Estresse – 3d	0,069 ± 0,014	0,005 ± 0,001	92,8
	Estresse – 7d	0,349 ± 0,043	0,025 ± 0,004	92,8
Epicótilo	Controle – 3d	-	-	-
	Controle – 7d	0,321 ± 0,041	0,024 ± 0,003	92,5
	Estresse – 3d	-	-	-
	Estresse – 7d	0,264 ± 0,066	0,019 ± 0,004	92,8
Folha	Controle – 3d	0,012 ± 0,002	0,002 ± 0,000	83,3
	Controle – 7d	0,016 ± 0,001	0,003 ± 0,000	81,3
	Estresse – 3d	0,008 ± 0,001	0,001 ± 0,000	87,5
	Estresse – 7d	0,013 ± 0,004	0,002 ± 0,000	84,6

Tabela 6. Matéria fresca, matéria seca e teor de água da raiz, hipocótilo, epicótilo e folha de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Vita 5 após 3 e 7 dias de semeadura em condições controle e em presença de NaCl 100 mM.

nenhuma alteração em presença de NaCl. O hipocótilo, com 3 dias de germinação em presença de NaCl, apresentou uma diminuição do seu peso fresco em torno de 80% e com 7 dias de germinação essa diminuição do peso fresco foi de 13%. No Epicótilo não foi possível analisar o efeito do NaCl, pois ocorreu o aparecimento desse tecido somente com 7 dias em condições controle. Nas folhas essa análise foi feita somente com 7 dias de germinação e observa-se um decréscimo do peso fresco em torno de 20% na presença de NaCl 100 mM. Com relação aos resultados com peso seco, observa-se que essas medidas são concordantes com os obtidos com os pesos frescos. Os resultados obtidos para o teor de água em todos os tratamentos apresentaram pequenas variações.

Na tabela 6, são apresentados os valores de peso fresco, de peso seco e do teor de água para os diferentes tecidos de Vita 5 após 3 e 7 dias de germinação. O sistema radicular apresentou um decréscimo de 34% com 3 dias de germinação em presença de NaCl 100 mM enquanto que com 7 dias de germinação esse decréscimo não foi significativo (2%). O hipocótilo apresentou um decréscimo de 70% do seu peso fresco com 3 dias de tratamento salino, enquanto que, com 7 dias de germinação não houve diminuição do peso fresco, mas um pequeno aumento de 16%. Com relação ao epicótilo, não foi possível analisar o efeito do NaCl com 3 dias de germinação pois não ocorreu o aparecimento desse tecido. Entretanto, com 7 dias de germinação observou-se um decréscimo do peso fresco de 20% em condições de estresse salino. A folha apresentou um decréscimo de 33% e de 20% com 3 e 7 dias de germinação, respectivamente, em condições de estresse salino. O peso seco apresentou medidas concordantes com os obtidos para o peso fresco. Os resultados obtidos para o teor de água em todos os tratamentos apresentaram pequenas diferenças.

5.3.4. Dosagem de Elementos Minerais (Na^+ e K^+)

A distribuição dos íons Na^+ e K^+ foi investigada em diferentes órgãos das plântulas de *Vigna unguiculata*, cultivares Vita 3 e Vita 5, com 7 dias de germinação, no controle e em presença de NaCl 100 mM.

A Figura 29 mostra a distribuição de Na^+ no sistema radicular, hipocótilo e epicótilo. Neste gráfico pode-se observar que, em condições de estresse salino, o conteúdo de Na^+ é maior na raiz de Vita 3 do que na raiz de Vita 5. No entanto, no hipocótilo, a concentração de Na^+ , é maior em Vita 5 do que em Vita 3. No epicótilo pode-se observar baixas concentrações de Na^+ em ambos os cultivares.

A Figura 30 mostra a relação K^+/Na^+ no sistema radicular, no hipocótilo e no epicótilo. A relação K^+/Na^+ , no controle, foi maior em Vita 3 quando comparada à de Vita 5 em todas as partes estudadas da plântula. Em presença de 100 mM de NaCl, essa relação decresce a valores menores do que 1 na raiz de ambos os cultivares. Na parte aérea a relação K^+/Na^+ dos dois cultivares foi mais fortemente diferenciada: Vita 3 foi capaz de manter um valor do que Vita 5.

5.4. Funcionamento das Bombas de Prótons Durante o Estabelecimento da Plântula

5.4.1. A Atividade de Hidrólise da V-ATPase e da H^+ -PPase de Tonoplastos de Hipocótilo.

As atividades de hidrólise da V-ATPase de hipocótilos de *Vigna unguiculata* cv. Vita 3 e Vita 5 foram medidas com 3, 4, 5, 6 e 7 dias de germinação. A Figura 31A mostra a atividade de hidrólise da ATPase de hipocótilos de Vita 3 e de Vita 5 ao longo do tempo de

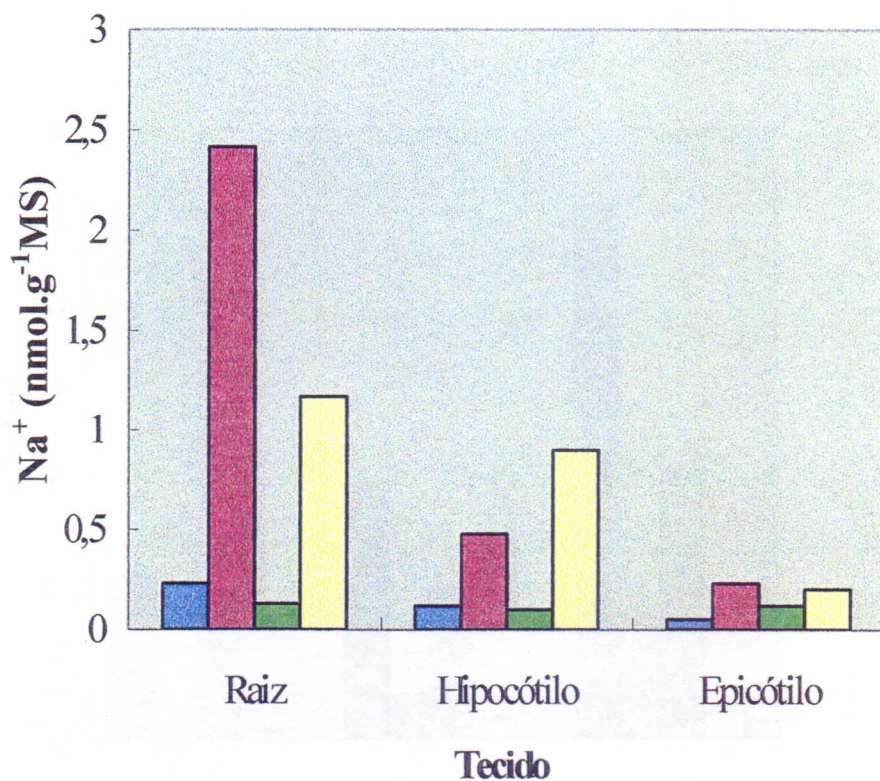


Figura 29. Teor de Na⁺ em raízes, epicótilos e hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, cv. Vita 3 em condições controle (■) ou em presença de NaCl 100 mM (■) e do cv. Vita 5 em condições controle (■) ou em presença de NaCl 100 mM (■).

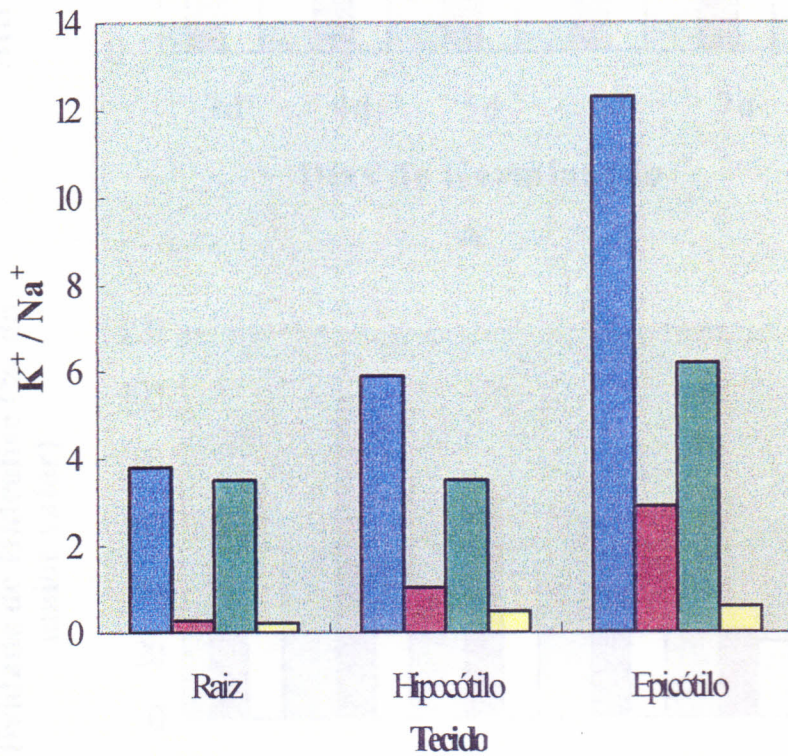
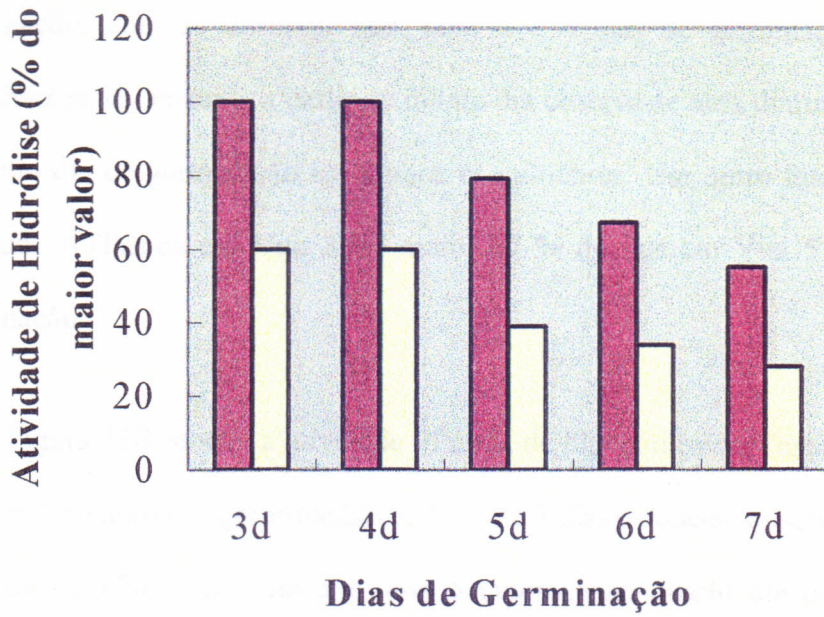
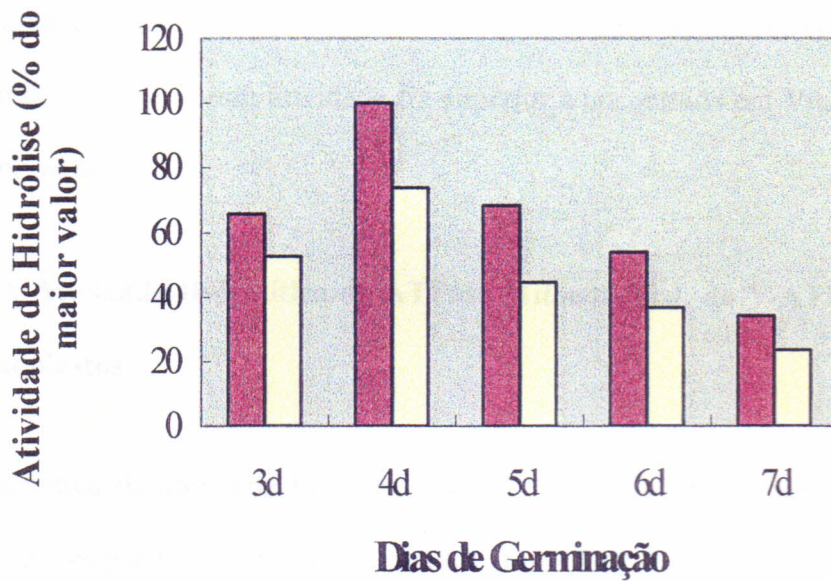


Figura 30. Relação K^+/Na^+ em raízes, epicótilos e hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, cv. Vita 3 em condições controle (■) ou em presença de NaCl 100 mM (■) e do cv. Vita 5 em condições controle (■) ou em presença de NaCl 100 mM (■).



A



B

Figura 31. Atividade de hidrólise da (A) V-ATPase e da (B) H⁺PPase de tonoplasto de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 3 (■) e Vita 5 (■) germinadas em água. O resultado mostra um experimento representativo de três repetições.

germinação. Pode-se observar que, com 3 e 4 dias de germinação as atividades são semelhantes. No entanto, a partir do quinto dia observa-se uma diminuição da atividade até o sétimo dia de germinação em ambos os cultivares. Um outro fato observado foi que a atividade ATPásica em Vita 3 foi maior 67 % do que em Vita 5 em todos os dias de germinação.

A Figura 31B mostra a atividade PPásica de hipocótilos de *Vigna unguiculata* cv. Vita 3 e Vita 5 ao longo da germinação (3, 4, 5, 6 e 7 dias). Pode-se observar, que a atividade de hidrólise da PPase em Vita 3 e Vita 5 aumenta no quarto dia de germinação quando comparada àquela do terceiro dia. No entanto, a partir do quarto dia de germinação observa-se uma diminuição da atividade de hidrólise até o sétimo dia em ambos os cultivares. Em Vita 3 essa atividade foi superior à encontrada em Vita 5, em todos os dias de germinação.

5.4.2. A Atividade Hidrolítica da ATPase Mitocondrial, da V-ATPase e da H⁺-PPase de Tonoplastos

A cinética da atividade hidrolítica da ATPase mitocondrial, da V-ATPase e da H⁺-PPase de tonoplastos de diferentes tecidos (hipocótilo e epicótilo) de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 foi determinada com 3 e 7 dias de germinação em água. Na Figura 32 podemos observar que a atividade da ATPase vacuolar do hipocótilo decresce no sétimo dia de germinação em comparação à do terceiro dia. A atividade ATPásica mitocondrial também decai no sétimo dia de germinação, acompanhando o decréscimo ocorrido com a atividade ATPásica vacuolar. Essas atividades ATPásicas caminham paralelamente também no epicótilo, onde igualmente ocorre um decréscimo de ambas as enzimas, no sétimo dia de germinação. Embora, a atividade PPásica do

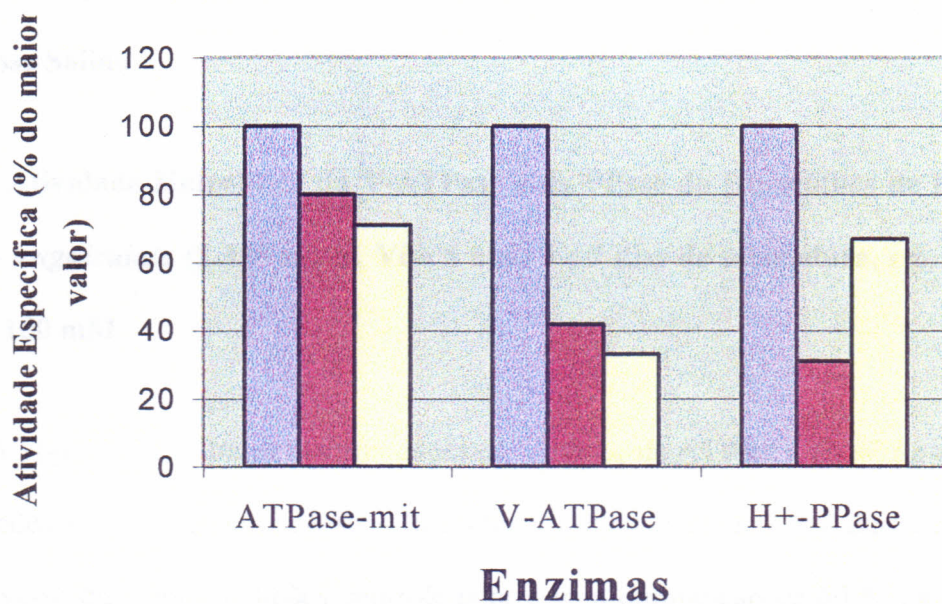


Figura 32. Atividade de hidrólise da ATPase mitocondrial, V-ATPase e H⁺-PPase de tonoplastos de hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 após 3 (■) e 7 dias (■) de semeadura e de epicótilo de plântulas com 7 dias (■) de semeadura em água. Os resultados mostram um experimento representativo de três repetições.

hipocótilo, tenha decaído no sétimo dia de germinação em relação ao terceiro dia, no epicótilo observa-se um aumento da atividade PPásica de 103 % em relação ao hipocótilo com 7 dias de germinação.

5.5. Participação das Bombas de Prótons Vacuolares (V-ATPase e H⁺-PPase) no Estresse Salino

5.5.1. Atividade Hidrolítica da V-ATPase e da PPase de Hipocótilos de Plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 após 3 e 7 dias de semeadura, em Presença de NaCl 100 mM

A Figura 33 mostra as das atividades de hidrólise da ATPase e da PPase de Vita 5 em condições controle e de estresse salino (NaCl 100mM) com 3 e 7 dias de semeadura. Observa-se que, em condições controle ocorre uma diminuição de 60 % da atividade da ATPase no sétimo dia de germinação quando comparada ao terceiro. Contudo, em condições de estresse salino (NaCl 100 mM) a atividade ATPásica aumenta 30 % no sétimo dia de germinação quando comparada à do terceiro dia. Já a atividade PPásica no controle, apresenta um decréscimo de 70 % no sétimo dia de semeadura em relação ao terceiro. No entanto, em presença de NaCl 100 mM, a atividade PPásica apresenta um decréscimo de 30 % no sétimo dia quando comparada à atividade do terceiro dia de germinação.

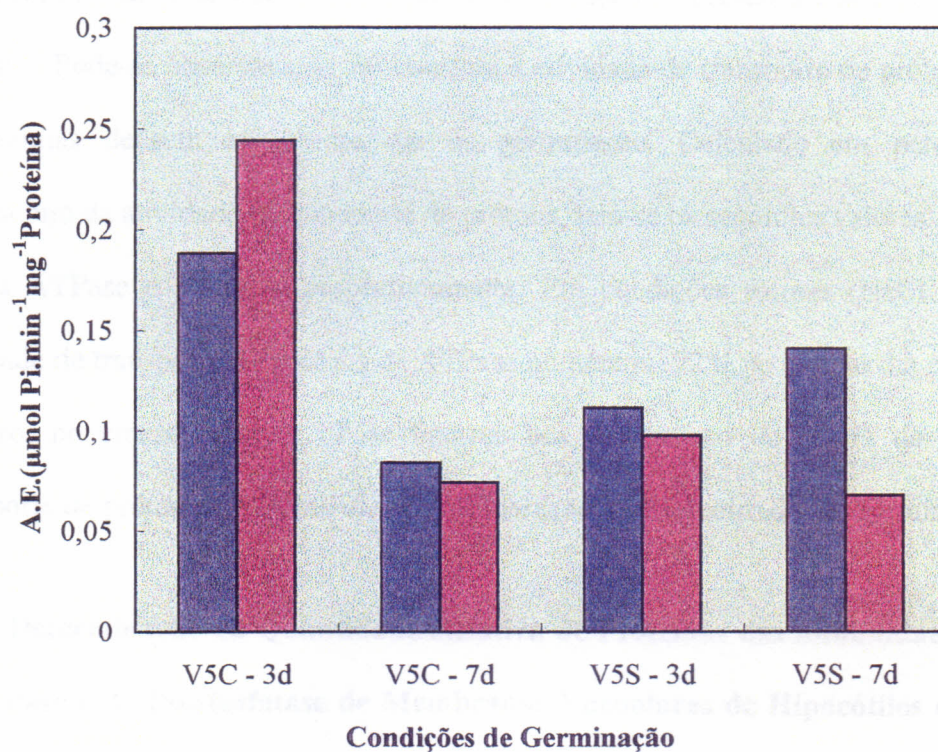


Figura 33. Atividade de hidrólise da (■) V-ATPase e (■) H⁺-PPase de tonoplastos de hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 germinadas em condições controle e de estresse salino (NaCl 100 mM) durante 3 e 7 dias. A figura mostra um gráfico representativo de três experimentos usando diferentes preparações.

5.5.2. Atividade de Transporte de Prótons da V-ATPase e da PPase de Hipocótilos de Plântulas de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 com 3 e 7 dias de Semeadura, em Presença de NaCl 100 mM

A Figura 34 mostra as atividades de transporte de prótons da V-ATPase e H⁺-PPase de hipocótilos de Vita 5 com 3 e 7 dias de germinação na presença e ausência de 100 mM de NaCl. Pode-se observar que, no controle a atividade de transporte de prótons de ambas as enzimas decaem no sétimo dia de germinação. Calculado em percentagem de decréscimo da atividade de transporte de prótons, tem-se os seguintes valores: 18 % e 67 % para a ATPase e a PPase, respectivamente. Em condições salinas (NaCl 100 mM), a atividade de transporte de prótons da ATPase aumentou 72% no sétimo dia em relação ao terceiro, no entanto para a PPase ocorreu um decréscimo de 54 % da atividade de transporte de prótons no sétimo dia em comparação à do terceiro dia de germinação.

5.5.3. Determinação da Quantidade Relativa de Proteínas das Subunidades A e B da V-ATPase e da Pirofosfatase de Membranas Vacuolares de Hipocótilos de Plântulas de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 com 3 e 7 dias de Semeadura, em Presença de NaCl 100 mM

Observa-se na Figura 35 A a presença das proteínas de tonoplastos de hipocótilos de Vita 5 com 3 e 7 dias de germinação na presença e ausência de 100 mM de NaCl, detectadas imunologicamente através de Western blot com anticorpos contra a subunidade A da V-ATPase de *Vigna radiata*. A Figura 35B apresenta a análise do teor protéico dessas amostras feita por densitometria. No controle, a quantidade de proteína da subunidade A da V-ATPase de hipocótilos de Vita 5 decresceu 30 % no sétimo dia de germinação em relação ao terceiro dia. Pode-se observar que, em presença de NaCl 100 mM a quantidade

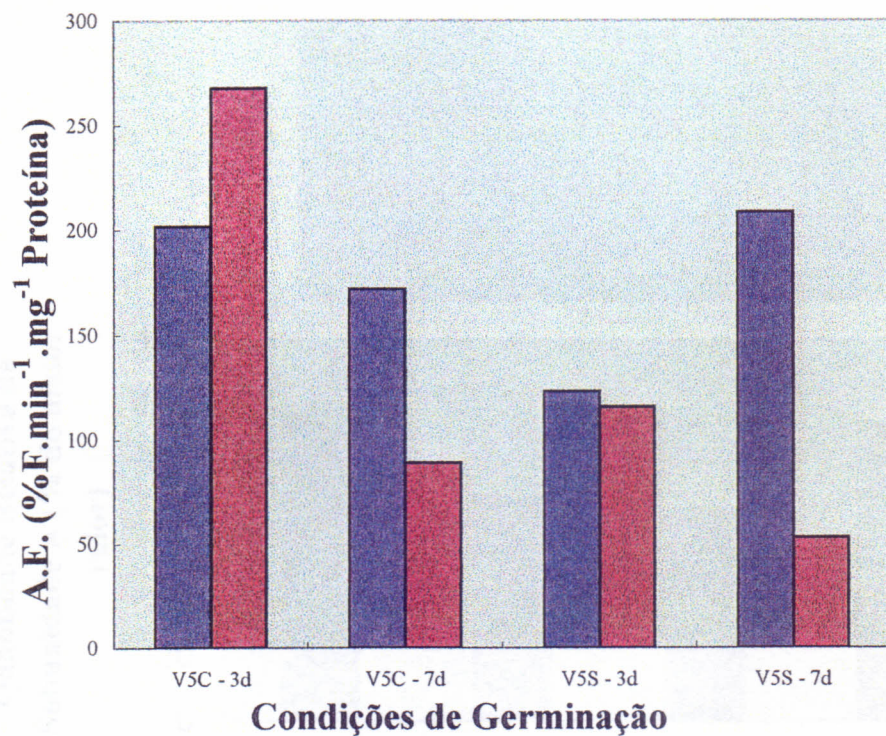


Figura 34. Transporte de prótons da V-ATPase (■) e da H⁺-PPase (■) de vesículas de tonoplasto de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 em condições de controle e em presença de NaCl 100 mM, após 3 e 7 dias de semeadura.

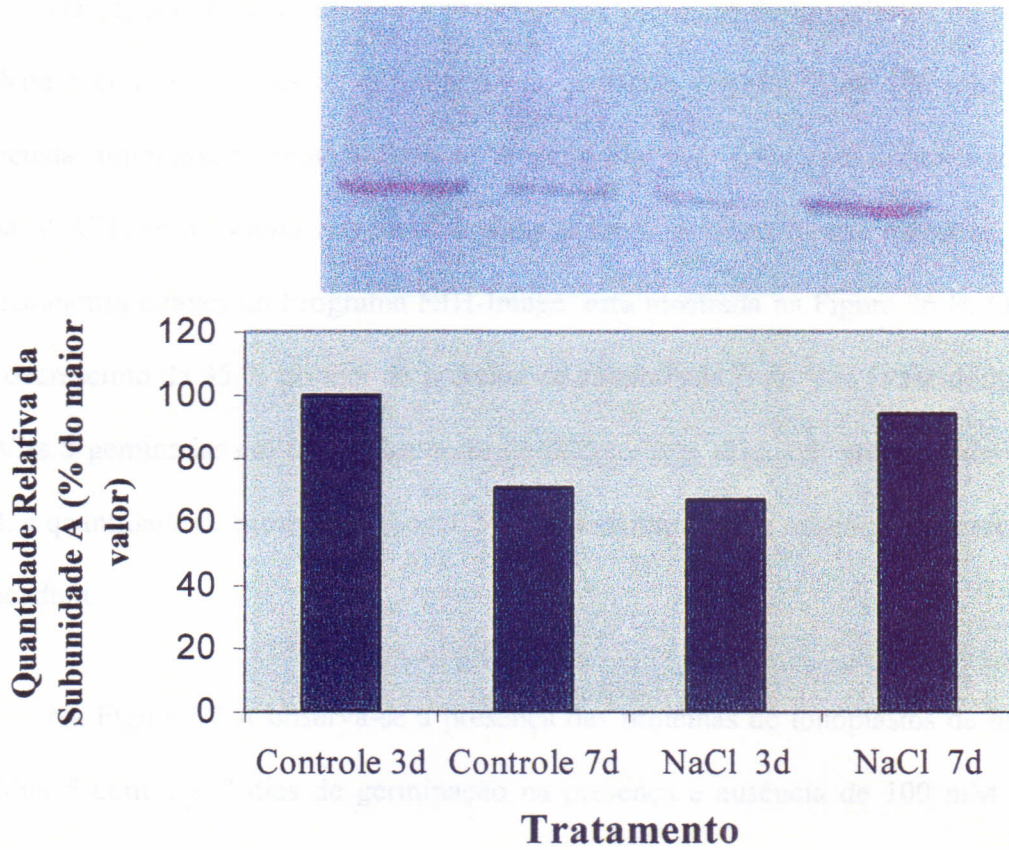


Figura 35. Quantidade relativa da subunidade A da V-ATPase, em membranas vacuolares de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 em condições controle e em presença de NaCl 100 mM, após 3 e 7 dias de semeadura, imunodetectadas com anticorpos produzidos contra a subunidade A da V-ATPase de *Vigna radiata*.

de proteína aumenta ca. 40 % no sétimo dia em relação à do terceiro dia de germinação com o mesmo tratamento.

Na Figura 36 A observa-se a presença das proteínas de tonoplastos de hipocótilos de Vita 5 com 3 e 7 dias de germinação na presença e ausência de 100 mM de NaCl, detectadas imunologicamente através de Western blot com anticorpos contra a subunidade B da V-ATPase de *Vigna radiat*. A análise do teor protéico dessas amostras, feita por densitometria através do Programa NIH-Image, está mostrada na Figura 36 B. Observa-se um decréscimo de 35 % no teor de proteína da subunidade B da V-ATPase de hipocótilos de Vita 5 geminadas em condições controle durante sete dias. Em presença de NaCl 100 mM, a quantidade de proteína aumenta 51 % no sétimo dia em relação à do terceiro dia de semeadura.

Na Figura 37 A observa-se a presença das proteínas de tonoplastos de hipocótilos de Vita 5 com 3 e 7 dias de germinação na presença e ausência de 100 mM de NaCl, detectadas imunologicamente através de Western blot com anticorpos contra a PPase de *Vigna radiata*. A análise do teor protéico dessas amostras, feita por densitometria, está mostrada na Figura 37 B. No controle, a quantidade de proteína da H⁺-PPase de hipocótilos de Vita 5 decresceu 33 % no sétimo dia de germinação em relação à do terceiro dia. No entanto, pode-se observar que, em presença de NaCl 100 mM a quantidade de proteína detectada no sétimo dia é semelhante à encontrada no terceiro dia de germinação.

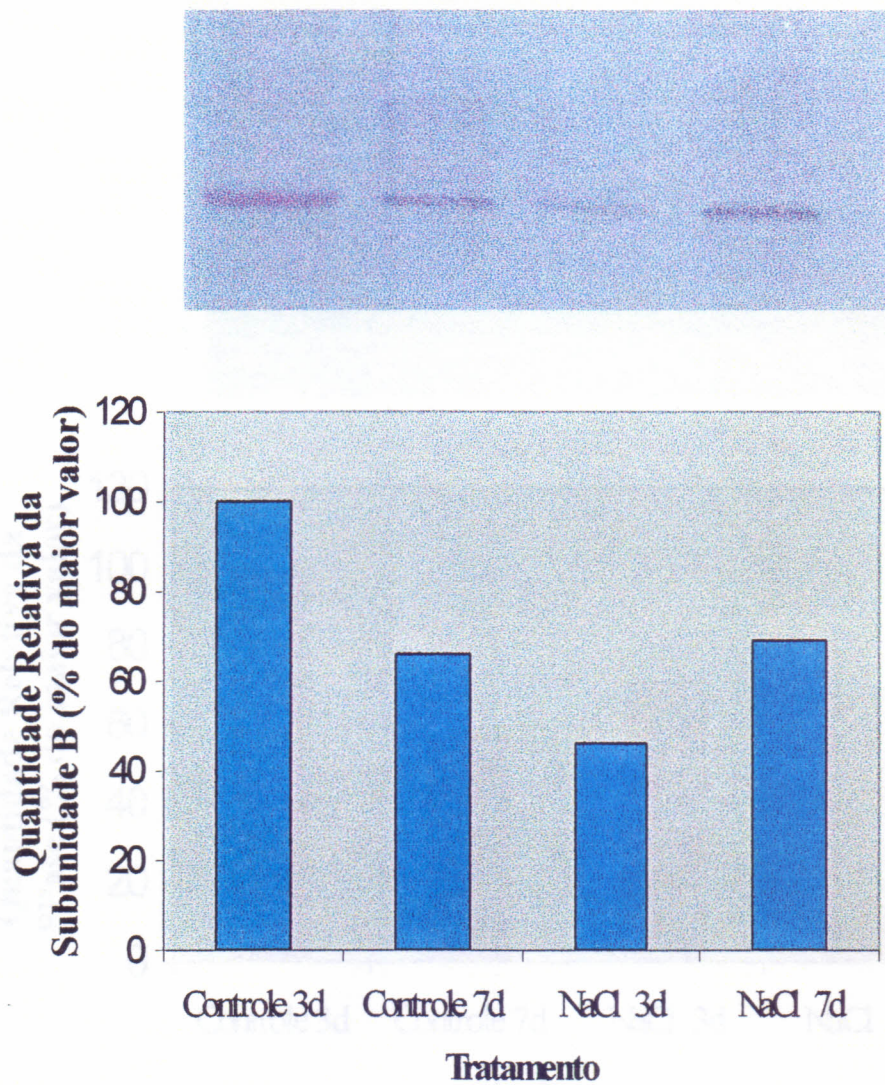


Figura 36. Quantidade relativa da subunidade B da V-ATPase em membranas vacuolares de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 em condições controle e em presença de NaCl 100 mM, após 3 e 7 dias de semeadura, imunodetectadas com anticorpos produzidos contra a subunidade B da V-ATPase de *Vigna radiata*.

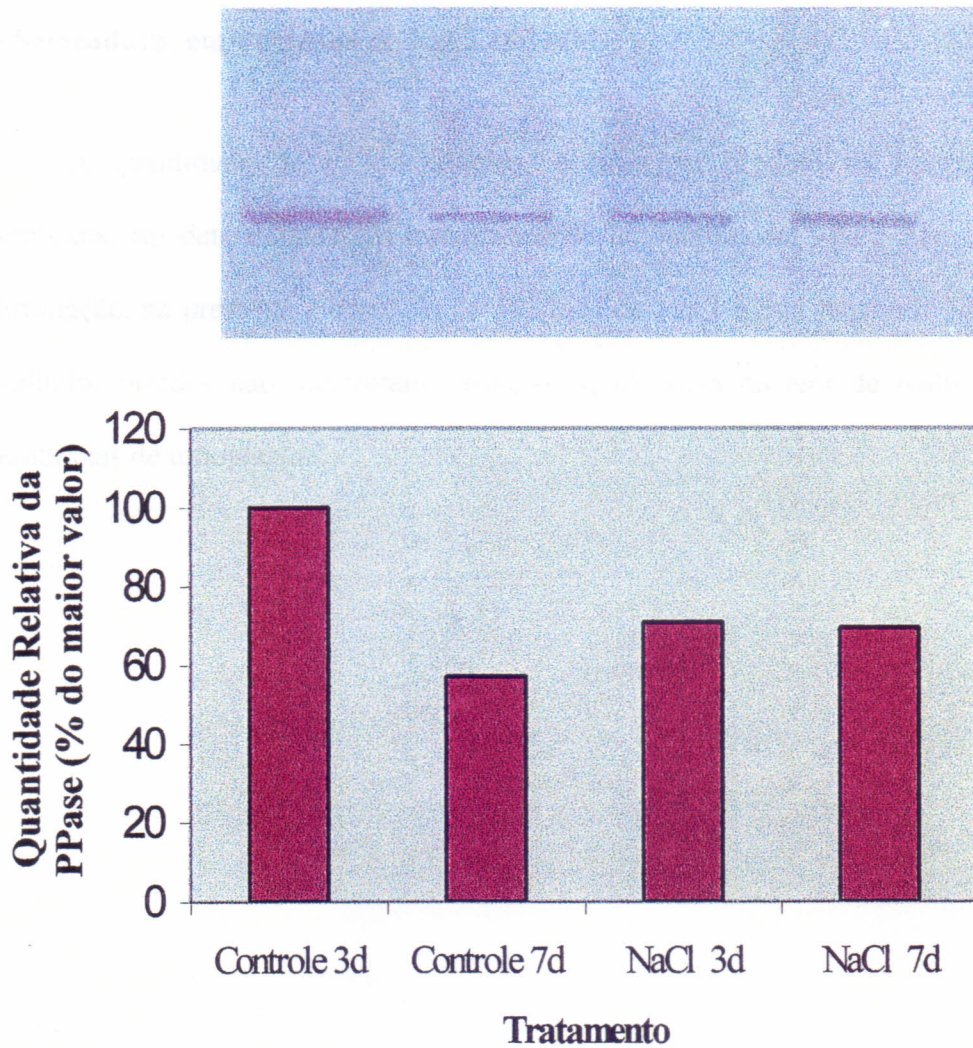


Figura 37. Quantidade relativa da PPase em membranas vacuolares de hipocótilos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 em condições controle e em presença de NaCl 100 mM, após 3 e 7 dias de semeadura, imunodetectadas com anticorpos produzidos contra a PPase de *Vigna radiata*.

5.5.4. Determinação do Teor de Malondialdeído nas Frações de Membranas Vacuolares de Hipocótilos de Plântulas de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 com 3 e 7 dias de Semeadura, em Presença de NaCl 100 mM

A quantidade de malondialdeído, o principal produto da lipoperoxidação de membrana, foi determinada em tonoplastos de hipocótilos de Vita 5 com 3 e 7 dias de germinação, na presença e ausência de 100 mM de NaCl e está mostrada na Tabela 7. Os resultados obtidos não mostraram variação significativa no teor de malondialdeído das membranas de tonoplasto.

Condições de Germinação	Malondialdeido $\mu\text{mol} / \mu\text{g Prot}$
Controle – 3d	0.70
Controle – 7d	0.62
Estresse – 3d	0.68
Estresse – 7d	0.63

Tabela 7. Teor de Malondialdeido nas frações de membranas vacuolares de hipocótilos de plântulas de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 após 3 e 7 dias de germinação. Os resultados mostram a média de três experimentos. As diferenças dos resultados de 3 dias no controle para 3 dias no estresse e de 7 dias no controle para 7 dias no estresse não foram significativas considerando $P < 0,005$ de acordo com o teste PLSD de Fisher.

6. DISCUSSÃO

O papel das bombas de prótons transmembranares, H^+ -ATPase e H^+ -PPase, funcionando como mecanismos de transporte primário nas células vegetais, está atualmente bem estabelecido. Ambas enzimas, geram uma diferença de potencial eletroquímico de prótons através da membrana vacuolar e alguns sistemas de transporte ativo dessa membrana funcionam pelo mecanismo de contra-transporte, H^+ /substrato (Maeshima & Yoshida, 1989).

As bombas de prótons mais profundamente estudadas são as H^+ -ATPases, que utilizam a energia de hidrólise do MgATP para transportar prótons através da bicamada lipídica. As H^+ -ATPases, bombeadoras de prótons, foram identificadas na membrana plasmática, no tonoplasto e nas membranas de Golgi de vários tecidos vegetais. Foi também mostrado, que a atividade da H^+ -PPase estava presente no tonoplasto. Contudo, estudos recentes evidenciaram que a H^+ -PPase tem uma dupla localização e para tal demonstração foram utilizados anticorpos ouro-conjugados contra a H^+ -PPase vacuolar. Nesse caso, tonoplasto e membrana plasmática apresentaram-se completamente marcados, confirmando a dupla localização da H^+ -PPase. Assim, ambas enzimas, ATPase e PPase não são mais reconhecidas como marcadoras apenas de vacúolo, como era anteriormente admitido.

Na Figura 10 detectamos as atividade de hidrólise e as atividades associadas ao transporte de H^+ da V-ATPase e da PPase, além do tonoplasto, nas frações admitidas como correspondentes às membranas do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático, por sua localização no gradiente. Não foi possível avaliar a pureza, isto é, a presença de mais de um tipo de membrana em cada fração, por intermédio de enzimas marcadoras. Contudo, as presenças da V-ATPase e da PPase foram reconhecidas e admitidas como localizadas nas frações correspondentes aos tonoplastos, às membranas do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático, tomando como base os achados de gradientes usados na separação dessas frações em outros trabalhos. Em células de raiz de aveia, Herman *et al.* (1994) encontraram a V-ATPase associada às membranas vacuolares na fração entre 20 e 22% de sacarose e ao complexo de Golgi, na fração entre 31 e 34% de sacarose do gradiente o que corresponde às frações obtidas com as endomembranas equivalentes de *V. unguiculata*. Houve somente, uma discrepância em relação à fração do retículo endoplasmático, encontrado por Herman *et al.* (1994) na fração do gradiente entre 28 e 31% de sacarose enquanto a fração equivalente de *V. unguiculata* foi encontrado na fração entre 40 e 50% de sacarose do gradiente.

As atividades de hidrólise da ATPase sensível ao nitrato (V-ATPase) e da pirofosfatase dependente de K^+ (H^+ -PPase) foram detectadas tanto em tonoplasto quanto em complexo de Golgi e retículo endoplasmático. No entanto, o transporte de prótons foi detectado somente em tonoplasto e membranas de Golgi. As medidas das atividades foram realizadas em hipocótilos com 7 dias de semeadura, portanto, a atividade ATPásica é esperada ser maior do que a PPásica (Nakanishi & Maeshima, 1998). Contudo, nas membranas de Golgi a proporção de ATPase e PPase não é a mesma encontrada no vacúolo o que sugere não se tratar de uma contaminação mas da presença de outro tipo de membrana.

Os demais resultados do presente trabalho foram obtidos com as bombas de prótons situadas na fração identificada como tonoplasto e separada usando-se um gradiente de 25% de sacarose, uma vez que ela foi também identificada a 25% de sacarose por Hsu *et al.* (1993) trabalhando com raiz de milho.

As propriedades funcionais e de regulação das bombas de prótons (ATPase e PPase) vacuolares foram determinadas avaliando-as sob os aspectos de hidrólise e transporte de prótons catalisados por essas mesmas enzimas (Figuras 11 a 23).

As condições ótimas de funcionamento dessas bombas (temperatura, pH, sensibilidade a íons, a inibidores e à concentração de substrato) variam entre as mesmas e entre as diversas espécies vegetais (Colombo & Cerana, 1993; Wang *et al.*, 1986). No presente trabalho, as atividades das bombas de prótons foram medidas tanto com relação à hidrólise de ATP e PPi quanto em relação ao transporte de prótons através da membrana. O efeito da temperatura sobre as atividades hidrolíticas da ATPase e da PPase (Figura 11) e sobre as atividades de transporte igualmente da ATPase e da PPase (Figura 17) de tonoplastos de *Vigna unguiculata* foi determinado e ao que se saiba não foram encontrados outros estudos com relação a esse parâmetro com as bombas de prótons dessa espécie vegetal. Na Figura 11 verifica-se que o aumento de temperatura tem um efeito mais pronunciado sobre a ATPase até um limite de 50 °C a partir da qual a temperatura passa a ter maior influência sobre a PPase o que é sugerido ser uma função compensadora dessas duas enzimas quando as plantas estão submetidas a condições adversas (Sze *et al.*, 1999). Na Figura 17 o efeito divergente da temperatura não é observado sobre o transporte de prótons catalisados pelas duas enzimas. Aparentemente, isso poderia ser explicado porque o transporte é executado através da própria membrana que estaria igualmente afetado para ambas as enzimas e não um efeito enzima-dependente como seria o caso das atividades de hidrólise.

Os resultados obtidos com o estudo do efeito do pH (Figura 12 A e B e Figura 18), dos íons (Figura 13, Figura 14, Figura 15 e Figura 19, Figura 20 e Figura 21) dos inibidores (Figura 22) e com a determinação dos parâmetros cinéticos, V_{max} e K_m (Figura 16 e Figura 23) nas atividades de hidrólise e de transporte de prótons da V-ATPase e da PPase mostraram que, o funcionamento dessas bombas de prótons nos tonoplastos de hipocótilos de *V. unguiculata* não diferem significativamente dos resultados obtidos em outras espécies vegetais (Ballesteros *et al.*, 1996).

Altas concentrações de NaCl têm-se mostrado prejudiciais ao crescimento das plantas, entretanto, seus efeitos variam com as diferentes espécies vegetais. *Vigna unguiculata*, assim como outros feijões, é capaz de excluir de maneira eficiente os íons Na^+ e as espécies tolerantes parecem impedir o transporte de Na^+ para a parte aérea evitando o efeito prejudicial do sal no metabolismo vegetal (Marschner, 1986, Fernandes de Melo *et al.*, 1994).

Apesar da pesquisa sobre o efeito da salinidade em plantas já haver completado várias décadas, a causa da toxicidade pelo sódio ainda permanece controversa (Davenport *et al.*, 1997). Os sintomas específicos da toxicidade pelo sódio incluem alta concentração de Na^+ e baixa relação K^+/Na^+ nos tecidos, inibição do crescimento da raiz e deficiência de Ca^{2+} na parte aérea (Maas & Grieve, 1987).

Nesse estudo, retomamos alguns parâmetros de caracterização do estresse salino com os cultivares Vita 3, mais tolerante e Vita 5, menos tolerante ao sal, para fazermos um estudo mais detalhado sobre a participação das bombas de prótons nos mecanismos de ajustamento desses cultivares às condições de estresse salino.

As Figuras 24, 25 e 26, mostram uma caracterização visual dos efeitos de diferentes concentrações de NaCl sobre o crescimento de plântulas dos cultivares Vita 3 e Vita 5, ao longo do tempo, deixando ver as diferenças de tolerância ao efeito do NaCl que foram maiores no cultivar Vita 5 (menos tolerante), que no cultivar Vita 3 (mais tolerante) ao sal. A Figura 24 mostra que as plântulas dos cultivares Vita 3 e Vita 5 tiveram o crescimento da parte aérea reduzido em aproximadamente 60 % com o tratamento com NaCl 100 mM e mais de 90% com NaCl 200 mM após 7 dias de semeadura. Selecionamos trabalhar com um estresse salino de 100 mM de NaCl, por ter sido a concentração mínima de NaCl que melhor evidenciou a redução de crescimento nas plântulas em ambos os cultivares. Nas Figuras 25 e 26 pode-se observar as boas condições em que se apresentam as plântulas de Vita 3 e de Vita 5 e a presença dos cotilédones ainda no 7º dia de semeadura.

Na procura de um parâmetro que pudesse servir ao estabelecimento de condições uniformes no estudo da participação das bombas de próton no estresse salino, determinamos parâmetros de crescimento, como podem ser vistos na Tabelas 4 (determinação da relação raiz/parte aérea). Podemos observar que, com 3 dias de germinação, a raiz e o hipocótilo de Vita 3 sofreram uma redução de crescimento de 33% e 56%, respectivamente, enquanto que em Vita 5 essa redução foi de 18% e 49%. Esses resultados indicam que o hipocótilo é o órgão mais severamente afetado pela exposição ao sal. As características de crescimento (raiz/parte aérea), apresentadas na Tabela 4 sugerem que Vita 3 seja o cultivar mais tolerante à presença de NaCl 100 mM do que Vita 5.

Outro parâmetro de crescimento foi o da determinação da curva de crescimento da raiz, como é mostrado na Figura 27. Nota-se aí que a taxa de crescimento da raiz de Vita 3, na presença de NaCl 100 mM, é maior do que em Vita 5, evidenciando que Vita 3 apresenta características de maior adaptabilidade ao estresse salino do que Vita 5. A

capacidade da raiz de crescer em condições de estresse salino é considerada um importante parâmetro para auxiliar as plantas glicófitas a sobreviver em meios salinos (Kafkafi, 1991).

Analisando a relação raiz/parte aérea com 3 dias de semeadura (Tabela 4), no controle e em presença de NaCl 100 mM, observamos que na presença de NaCl ocorre um aumento de 1,5 vezes na relação raiz/parte aérea em relação ao controle. Esse aumento de 1,5 vezes é o mesmo com 3 dias de germinação para ambos os cultivares. Contudo, observamos que esse aumento na relação raiz/parte aérea é 81% maior em Vita 3 do que em Vita 5. Esses resultados do incremento da relação raiz/parte aérea sugerem que no início do estabelecimento da plântula (3 dias) não é revelada a diferença entre os cultivares Vita 3 e Vita 5 com relação à adaptabilidade ao estresse salino, que somente com 7 dias de semeadura, torna-se mais evidente (Figura 28). De acordo com os resultados, podemos dizer que somente com 7 dias de germinação, o uso desses parâmetros podem distinguir os cultivares de *Vigna unguiculata* com relação a sua tolerância ao estresse salino.

Com os dados das Tabelas 5 e 6 ficam reforçados os argumentos em favor da escolha do hipocótilo para o presente estudo porque ele é o órgão que mais parece perder massa fresco em condições de estresse salino.

A distribuição dos íons Na^+ e K^+ foi investigada em diferentes órgãos de plântulas de *Vigna unguiculata*, Vita 3 e Vita 5, com 7 dias de germinação, no controle e em presença de NaCl 100 mM. Na raiz, foram encontradas altas concentrações de Na^+ , sendo essas concentrações maiores em Vita 3 do que em Vita 5. Já nos hipocótilos, a concentração de Na^+ é maior em Vita 5 do que em Vita 3 (Figura 29). Esses resultados indicam que, em Vita 3 os íons Na^+ são mantidos principalmente na raiz e parte no hipocótilo, protegendo a parte superior dos efeitos do sal. Vita 5, no entanto, retém menos

Na^+ na raiz, deixando passar mais Na^+ para o hipocótilo. Em ambos os casos o hipocótilo parece funcionar como barreira (essa barreira sendo mais efetiva em Vita 3 que em Vita 5) contra a passagem de Na^+ para a parte superior da planta, dessa forma protegendo as folhas dos danos causados pelo Na^+ . Esses resultados concordam com aqueles encontrados por Jacob (1964) e Fernandes de Melo *et al.* (1994) com hipocótilos não estiolados de *Vigna unguiculata*. A Figura 30 mostra os valores da relação Na^+/K^+ nos 2 cultivares, Vita 3 e Vita 5 e confirma os valores mais elevados dessa relação no cultivar Vita 3 indicando sua maior tolerância ao sal (Fernandes de Melo *et al.*, 1994).

O desempenho das bombas de prótons do tonoplasto dos cultivares Vita 3 e Vita 5 (V-ATPase e PPase) foi analisado ao longo do estabelecimento da plântula e a Figura 31 mostra que o cultivar Vita 5 tem uma atividade de ambas as bombas mais baixa do que o cultivar Vita 3. Aparentemente, essa diferença poderia ser invocada na fundamentação da menor capacidade de Vita 5 de resistir às condições de estresse salino, isto é, haveria um menor funcionamento das bombas no cultivar menos tolerante ao estresse. Ainda pode ser observado que, a diferença de atividade da V-ATPase entre os dois cultivares é maior do que a diferença da PPase.

O crescimento dos hipocótilos é impossível sem a expansão do vacúolo, pois ele ocupa mais de 80% do volume da célula madura. Para manter uma alta pressão osmótica no vacúolo em expansão, ele deve incorporar solutos como açúcares e íons inorgânicos (Nakanishi & Maeshima, 1998). A ATPase e a PPase vacuolares fornecem a energia para os transportadores ativos secundários. Portanto, as bombas de prótons vacuolares são essenciais para o aumento do vacúolo e conseqüentemente para a alongação celular e o crescimento dos tecidos. O substrato para a PPase, o PPi, é produzido como um subproduto de vários processos metabólicos, como a polimerização do DNA e do RNA como a síntese

de aminoacil-tRNA (síntese de proteína), a síntese de amido, a síntese da celulose, e a β -oxidação de ácidos graxos. Esses processos são bastante ativos nas células em crescimento e grandes quantidades de PPI são produzidas. O PPI acumulado no citossol em altas concentrações inibe a biossíntese das macromoléculas. Nas plantas, o PPI é removido pela H^+ -PPase de vacúolo que utiliza como fonte de energia para o transporte ativo de prótons para o vacúolo. Na célula madura a atividade metabólica decresce e o PPI não é mais disponível em grandes quantidades. Como consequência, a expressão gênica da H^+ -PPase é suspensa após a maturação celular (Nakanishi & Maeshima, 1998). Os resultados mostrados na Figura 31 B obtidos com a H^+ -PPase de *Vigna unguiculata* foram semelhantes aos apresentados por Nakanishi & Maeshima (1998) trabalhando com hipocótilos de *Vigna radiata*. Eles mostraram que, as atividades de hidrólise e de transporte de prótons da V-ATPase eram constantes durante o crescimento de hipocótilos e que a atividade de hidrólise de PPI e de transporte dependente de PPI nas membranas vacuolares decresceram durante a alongação do tecido.

O fato de existir uma diferença entre as atividades V-ATPásicas dos cultivares Vita 3 e Vita 5 (Figura 31) foi correlacionado com o que já fora observado com a atividade da ATPase mitocondrial, mostrada anteriormente ser maior em Vita 3 do que em Vita 5 (Fernandes de Melo *et al.*, 1994). Assim, foi feita uma exploração conjunta das bombas de prótons da mitocôndria e do tonoplasto de hipocótilos e de epicótilos do cultivar Vita 5 (Figura 32). Como se pode ver, as atividades da ATPase mitocondrial e da V-ATPase decrescem ao longo do tempo no hipocótilo e ao cabo de 7 dias no epicótilo. Contrariamente ao que ocorre com a atividade da PPase no hipocótilo que decresce em função do tempo, a atividade da PPase no epicótilo, aumenta (Figura 31). Os resultados da Figura 32 sugerem que, a regulação dessas bombas (V-ATPase e PPase) está relacionada com o crescimento do tecido e suprimento de substrato. O decaimento da atividade da V-

ATPase, ao longo do tempo, estaria ligado ao decaimento da atividade ATPásica mitocondrial no hipocótilo e no epicótilo. O epicótilo sendo o tecido em crescimento (7 dias) utiliza a PPase que é a enzima chave dos processos de crescimento dos tecidos (Nakanishi & Mashima, 1998).

O grau de tolerância das plantas ao estresse salino depende da possibilidade de uma osmorregulação e da exclusão de íons tóxicos do citoplasma pela saída desses íons através da membrana plasmática e/ou da compartimentalização desses íons no vacúolo (Colombo & Cerana, 1993). Já é um conhecimento amplamente admitido o de que o gradiente eletroquímico de prótons, $\Delta\mu\text{H}^+$, gerado pelo transporte de H^+ através do tonoplasto é responsável por facilitar a entrada dos íons Na^+ e Cl^- no vacúolo (Reuveni *et al.* 1990). A membrana vacuolar parece participar em tais mecanismos através do controle do fluxo de íons e solutos dependente de energia (Blumwald & Poole, 1987). Esses processos dependem do estabelecimento, no tonoplasto, de um gradiente eletroquímico gerado pelas duas enzimas translocadoras de prótons distintas que trabalham em paralelo: a V- H^+ -ATPase (Sze *et al.*, 1992) e a H^+ -PPase (Rea & Poole, 1993). Os resultados apresentados nas Figuras 33 a 37 mostram um estudo do efeito do estresse salino sobre as bombas de prótons vacuolares (V- H^+ -ATPase e H^+ -PPase) em hipocótilos de plântulas de *V. unguiculata* cv. Vita 5, escolhido por ser um cultivar menos tolerante aos efeitos do estresse salino. Os efeitos foram observados com NaCl 100 mM e após 3 e 7 dias de semeadura. Em presença de NaCl 100 mM, as atividades de hidrólise e de transporte de prótons da V-ATPase (Figuras 33 e 34) aumentam após 7 dias de semeadura, quando comparadas ao controle e as atividades de hidrólise e transporte de prótons da PPase, nas mesmas condições, decrescem. Esses resultados sugerem uma participação efetiva da V-ATPase no mecanismo de contraposição aos efeitos deletérios do sal o que não parece ocorrer com a PPase (Lehr *et al.*, 1999).

Com a quantificação do teor de proteínas referente às subunidades A e B da V-ATPase (Figuras 35 e 36) e da PPase (Figura 37) procurou-se determinar uma correspondência com as atividades enzimáticas. Os resultados referentes à V-ATPase indicam que não ocorreu inativação ou supressão da V-ATPase na membrana e o aumento da atividade ATPásica (Figuras 33 e 34) talvez seja devido ao aumento do conteúdo protéico da V-ATPase ocorrido nas membranas vacuolar em condições de estresse salino (Figuras 35 e 36). Quanto à PPase (Figura 37), o nível de proteína muda em paralelo com sua atividade sendo maior com 3 dias em comparação ao que ocorre com 7 dias de germinação no controle. Em condições de estresse, o nível de proteínas foi constante, embora ambas as atividades de transporte e de hidrólise da PPase tenham decrescido (Figuras 33 e 34). Os resultados sugerem uma inativação do transporte de prótons da PPase após o tratamento com sal o que poderia ter resultado do efeito deletério do tratamento salino sobre a membrana vacuolar. Contudo, essa possibilidade foi descartada pelo aumento da atividade de transporte da V-ATPase em membranas vacuolares de plantas igualmente submetidas ao tratamento salino.

Com o objetivo de verificar uma possível mudança na composição lipídica da membrana vacuolar durante o estresse salino, foi determinada a presença de malondialdeído, principal produto da peroxidação de lipídios nessas membranas isoladas de *V. unguiculata*. Como pode ser visto na Tabela 7 o tratamento com NaCl 100 mM não teve influência na peroxidação dos lipídios.

O resultado do estudo sobre a participação das bombas de prótons vacuolares (V-ATPase e H⁺-PPase) no estresse salino sugere que tal condição de estresse induz uma regulação distinta nas mencionadas bombas durante a elongação do tecido quando

comparada ao controle. Além disso, a V-ATPase e a PPase são reguladas de maneira independente quer em condições de estresse salino quer no controle.

7. CONCLUSÃO

O resultado do estudo sobre a participação das bombas de prótons vacuolares (V-ATPase e PPase) no estresse salino sugere que tal condição de estresse induz uma regulação distinta nas mencionadas bombas durante a elongação do tecido quando comparada ao controle. Além disso, a V-ATPase e a PPase são reguladas de maneira independente quer em condições de estresse salino quer em condições controle

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, M.S., AKAZAWA, T. – Association of H^+ -translocating ATPase in Golgi Membrane System form Suspension Cultured Cells of Sycamore. Plant Physiol. – v. 81, p. 222 - 227, 1986.
- AMZALLAG, G.N. E LERNER. H.R. – Physiological Adaptation of Plants to Environmental Stress. Handbook of Plant and Crop Physiology. M. Pessarakli Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1995.
- ARAÚJO, J.P.P., WATT, E.E. – O Caupi no Brasil. Brasília: EMBRAPA/CNPAF, 1988.
- ARNOLD, A., WOLF, H.U., ACKERMANN, B.P. *et al.* - An automated continuous assay of membrane-bound and soluble ATPases and related enzymes. Analyst. Biochem. v. 71, p. 209-213, 1976.
- BALLESTEROS, E., DONAIRE, J.P., BELVER, A. – Effects of Salt Stress on H^+ - ATPase and H^+ - Ppase Activities of Tonoplast-enriched Vesicles Isolated from Sunflower Roots. Phyologia Plantarum – v. 97, p. 259 – 268, 1996.
- BARKLA, B.J., CHARUK, J.H.M., CRAGOE, E.J. JR. *et al.* - Photolabelling of Tonoplast from Sugar Beet Cell Suspensions by [3H]5-(N-methyl-N-isobutyl)-amiloride, an Inhibitor of the Vacuolar Na^+/H^+ Antiport. Plant Physiol. v. 93, p. 924 – 930, 1990.

- BARKLA, B.J., PANTOJA, O. - Physiology of Ion Transport Across the Tonoplast of Higher Plants. Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. v. 47, p. 159 – 184, 1996.
- BAYKOV, A.A., DUBNOVA, E.B., BAKULEVA, N.P. *et al.* – Differential Sensivity of Membrane-associated Pyrophosphatases to Inhibition by diphosphonates and Fluoride Delineates Two Classes of Enzyme. FEBS – v. 327, p. 199 – 202, 1993.
- BEWLEY, J.D., BLACK, M. – Physiology and Biochemistry of Seeds. v. 1; Development, Germination and Growth. Springer-Verlag, New York, EE.UU, 1978.
- BEWLEY, J.D., BLACK, M. – Seeds: Physiology of Development and Germination. New York: Plenum Press, 1994.
- BINZEL, M.L. – NaCl-induced Accumulation of Tonoplast and Plasma Membrane H⁺-ATPase Message in Tomato. Physiologia Plantarum – v. 94, p. 722 – 728, 1995.
- BINZEL, M., HASEGAWA, P.M., RHODES, D., *et al.* – Solute Accumulation in Tobacco Cells Adapted to NaCl. Plant Physiol. v. 84, p. 1408 – 1415, 1987.
- BINZEL, M., HESS, F.D., BRESSAN, R.A., *et al.* – Intracellular Compartmentation of Ions in Salt Adapted Tobacco Cells. Plant Physiol. v. 86, p. 607 – 614, 1988.
- BLOOM, A., EPSTEIN, E. – Varietal Differences in Salt-induced Respiration in Barley. Plant Sci. Lett. v. 35, p. 1 – 3, 1984.
- BLUMWALD, E. POOLE, R.J. – Na⁺/K⁺ Antiport in Isolated Tonoplast Vesicles from Storage Tissues of *Beta vulgaris* L. Plant Physiol. v. 78, p. 163 – 167, 1985.

- BLUMWALD, E., POOLE, R.J. – Salt Tolerance in Suspension Cultures of Sugar Beet; Induction of Na^+/H^+ Antiport Activity at the Tonoplast by Growth in Salt. Plant Physiol. v. 83, p. 884 – 887, 1987.
- BOLLER, T., VOGELI, U. – Vacuolar Localization of Theylene – Induced Chintinase in Bean Leaves. Plant Physiol. v. 74, p. 442 – 444, 1984.
- BOLLER, T., WIEMKEN, A. – Dynamics of Vacuolar Compartmentation. A. Rev. Plant Physiol. v. 37, p. 137 – 164, 1986.
- BOWMAN, E.J., SIEBERS, A., ALTENDORF, K. – Bafilomycins: A Class of Inhibitors of Membrane ATPases from Microorganisms, Animal Cells, and Plant Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 85, p. 7972 - 7976, 1988.
- BREMBERGER, C, HASCHKE, H-P, LÜTTGE, U. Separation and Purification of the Tonoplast ATPase and Pyrophosphatase from Plants with Constitutive and Inducible Crassulacean Acid Metabolism. Planta. v. 175, p. 465 – 479, 1988.
- CASTRO, M.A.R. – Efeitos da Salinidade na Atividade de Enzimas Responsáveis pela Mobilização de Amido durante a Germinação da *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Pitiúba. Dissertação (Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – Ceará, 1982).
- CHANSON, A., FICHMANN, J., SPEAR, D. *et al.* – Pyrophosphate-driven Proton Transport by Microsomal Membranes of Corn Coleoptiles. Plant Physiol. – v. 79, p. 159 – 164, 1985.

- CHANSON, A., TAIZ, L. – Evidence for an ATP-dependent proton pump on the Golgi of Corn Coleoptiles. Plant Physiol. – v. 73, p. 921 - 928, 1985.
- CHURCHILL, K.A., HOLAWAY, B., SZE, H. – Separation of Two Types of Eletrogenic H⁺-Pumping ATPases from Oat Roots. Plant Physiol. v. 73, p. 921 – 928, 1983.
- COLOMBO,R., CERANA, R. – Enhanced Activity of Tonoplast Pyrophosphatase in NaCl-Grown Cells of *Daucus carota*. J. Plant Physiol. v. 142, p. 226 – 229, 1993.
- D'AUZAC, J. – Caractérisation d'une ATPase Membranaire en présence d'une Phosphatase Acide dans les Lutoïdes du Latex d'*Havea brasiliensis*. Phytochemistry. v. 14, p. 671 – 675. 1975.
- DAVENPORT, R.J., REID, R.J., SMITH, F.A. – Sodium-calcium Interactions in Two Wheat Species Differing in Salinity Tolerance. Physiologia Plantarum – v. 99, p. 323-327, 1997.
- DAVIS, J.M., POOLE, J.R., REA, P.A., *et al.* – Potassium Transport into Plant Vacuoles Energized directly by a Proton-Pumping Inorganic Pyrophosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 89, p. 11701 – 11705, 1992.
- DRÖSE, S., BINDSEIL, K.U., BOWMAN, E.J., *et al.* – Inhibitory Effects of Modified Bafilomycins and Concanamycins on P- and V-Type Adenosinetriphosphatases. Biochemistry – v. 32, p. 3902 – 3906. 1993.
- DuPONT, F.M., MORRISSEY, P. J.- Purification of Vacuolar ATPase from Barley Roots. Plant Physiol., v. 96 (S-13), 1991.

- ENEAS FILHO, J. – Efeitos da Salinidade na Mobilização de Carboidratos de Reserva de Feijão-de-Corda Pitiúba (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Durante a Germinação. Dissertação (Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil, 1979).
- FERNANDES DE MELO, D., JOLIVET, Y., FAÇANHA, A.R, *et al.* - .Effect of Salt Stress on Mitochondrial Energy Metabolism of *Vigna unguiculata* Cultivars Differing in NaCl Tolerance. Plant Physiol. – v. 32, p. 405 – 412, 1994.
- FINBOW, M.E., HARRISON, M. – The Vacuolar H⁺- ATPase: A universal Proton Pump of Eukaryotes. Biochem. J. v. 324, p. 697 – 712, 1997.
- FISKE, C. H., SUBBAROW, Y. - The colorimetric determination of phosphorous. J. Biol. Chem., v.66, p. 375-400, 1925.
- FLOWERS, T.J., TROKE, P.F., YEO, A.R. – The Mechanism of Salt Tolerance in Halophytes. Annu. Rev Plant Physiol. v. 28 p. 89 -121, 1977.
- FLOWERS, T.J., YEO, A.R. – Ion Relations of Plants under Drought and Salinity. Aust. J. Plant Physiol., v. 13, p. 75 – 91, 1986.
- FORGAC, M. – Structure and Function of Vacuolar Class of ATP-driven Proton Pumps. Physiological Reviews – v. 69, p. 765 – 796, 1989.
- GOGARTEN, J.P., KIBAK, H., DITTRICH, P., *et al.* – Evolution of the Vacuolar H⁺-ATPase: Implications for the Origin of Eukaryotes. Proc. Natl. Acad. Sci.- v. 86, p. 6661 – 6665, 1989.

- GOMES FILHO, E., PRISCO, J.T. - Effects of NaCl Salinity in Vivo and In Vitro on the Proteolytic Activity of *Vigna sinensis* (L.) Savi Cotyledons During Germination. Rev. Bras. Bot. v. 1, p. 83 – 88, 1978.
- GOMES FILHO, E., PRISCO, J.T., CAMPOS, F. A., *et al.*- Effects of NaCl Salinity *in vivo* and *in vitro* on Ribonuclease Activity of *Vigna unguiculata* Cotyledons during Germination. Physiol. Plant. v. 59, p. 183 – 188, 1983.
- GORNALL, A. G., BARDAWILL, J., DAVID, M.M. - Determination of serum proteins by means of the biuret reagent. J. Biol. Chem., v. 17, p. 751-766, 1949.
- GRAY, M.W. – Organelle Origins and Ribosomal RNA. Biochem. Cell Biol. v. 66, p. 325 – 348, 1988.
- GREENWAY, H., MUNNS, R. – Mechanisms of Salt Tolerance in Nonhalophytes. Ann. Rev. Plant Physiol. – v. 31, p. 149 – 190, 1980.
- GUIMARÃES, C.M. – Melhoramento e Práticas Culturais em Caupi Visando Incrementar a Resistência à Seca. In: O caupi do Brasil, Araújo, J.P.P., Watt, E.E.(ed.). Brasília: EMBRAPA/CNPAP, 1988.
- GUIMARÃES, C.M., ARAÚJO, J.P.P., WATT, E.E. – Variabilidade de Cultivares de Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) para Resistência à Seca. Goiânia: EMBRAPA/CNPAP, 1982.
- HARRIS, N. – Organization of the Endomembrane System. Annu. Rev. Plant Physiol. – v. 37, p. 73 - 92, 1986.

- HASENFRATZ, M., TSOU, C.L., WILKINS, T.A. – Expression of two Related Vacuolar H^+ -ATPase 16-Kilodalton Proteolipid Genes is Differentially Regulated in a Tissue Specific Manner. Plant Physiol. – v. 108, p. 1395 - 1404, 1995.
- HEATH R.L., PACKER L. - Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I-Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. v.125, p.189-198, 1968.
- HERMAN, E.M., LI, X., SU, T.R., *et al.* – Vacuolar-type H^+ -ATPase are Associated with the Endoplasmic Reticulum and Provacuoles of Root Tip Cells. Plant Physiol. v. 106, p. 1313 – 1324, 1994.
- HSU, A.F., RODENBACH, S., TU, S. – Separation of Tonoplast Vesicles Enriched in ATPase and Pyrophosphatase Activity from Maize Roots. J. Plant Physiol. v. 16, p. 1179 – 1192, 1993.
- IKUMA, H. - Necessary conditions for isolation of tightly coupled higher plant mitochondria. Plant Physiol., v. 45, p. 773-781, 1970.
- JACOB, B. – Function Of Bean Roots And Stems In Sodium Retention. Plant Physiol., v. 39, p. 445-449, 1964.
- JESCHKE, W.D. – K^+ - Na^+ Exchange at Cellular Membranes, Intracellular Compartmentation of Cations and Salt Tolerance. In: Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement. Staples, R.C., Toennissen, G.H. (ed.) New York: John Wiley & Son, 1984, p. 37 – 66.

- JOHNSON, D.W., SMITH, S.E., DOBRENZ, A.K. – Registration of AZ-90NDC-ST Alfalfa Germplasm. Crop Sci. v. 31 p. 1098 - 1099, 1991.
- KAFKAFI, U. – Root Growth Under Stress. Plant Roots – The Hidden Half – Edited by Yoav Waisel, Amram Eshel, Uzi Kafkats, Marcel Dekken; Inc., 1991.
- KARLSSON, J. – Membrane-bound Potassium and Magnesium Ion-stimulated Inorganic Pyrophosphatase from Roots and Cotyledons of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). Biochim. Biophys. Acta – v. 399, p. 356 – 363, 1975.
- KATSUHARA, M., TAZAWA, M. – Salt Tolerance in *Nitellopsis obtusa*. Protoplasma. v. 135, p. 155 – 161, 1986.
- KATZ, A., KABACK, R., AVRON, M. - Na^+/H^+ Antiport in Isolated Plasma Membrane Vesicles from the Halotolerant Alga *Dunaliella salina*. FEBS Lett. v. 202, p. 141 – 144, 1986.
- KIM, E.J., ZHEN R.G., REA, P.A. - Heterologous Expression of Plant Vacuolar Pyrophosphatase in Yeast Demonstrates Sufficiency of the Substrate-binding Subunit for Proton Transport. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 91, p. 6128 – 6132, 1994.
- KIM, E.J., ZHEN, R-G, REA, P.A. – Site Directed Mutagenesis of Vacuolar H^+ -Pyrophosphatase. Necessity of Cys⁶³⁴ for Inhibition by Maleimides but not Catalysis. J. Biol. Chem. v. 270, p. 2630 – 2635, 1995.
- KIMURA, T., MAESHIMA, M., ASAHI, T. – Immunological Studies on ATPases in Mung Bean Hypocotyl Plasma Membrane: Proposal of the Presence of two Molecular Species of ATPase. Plant Cell Physiol. – v. 29, p. 883 - 888, 1988.

KRAMER, D., MANGOLD, B., HILLE, A., EMIG, I, *et al.* – The head Structure of a Higher Plant V-type H^+ -ATPase is not Always an Hexamer but also a Pentamer. J. Exp. Bot. v. 46, p. 1633 – 1636, 1995.

KURTH, E., CRAMER, G.R., LAUCHLI, A. *et al.* – Effects of NaCl and $CaCl_2$ on Cell Enlargement and Cell Production in Cotton Roots. Plant Physiol. v. 82, p. 1102 – 1106, 1986.

LAEMMLI U.K. – Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. v. 227, p. 680 – 685, 1970.

LAI, S., WATSON, J.C., HANSEN, J.N., *et al.* – Molecular Cloning and Sequencing of cDNAs Encoding the Proteolipid Subunit of the Vacuolar H^+ -ATPase from a Higher Plant. J. Biol. Chem. v. 266, p. 16078 – 16084, 1991.

LEHR, A., KIRSCH, M., VIERECK, R., *et al.* - cDNA and Genomic Cloning of Sugar Beet V-type H^+ -ATPase Subunit A and c Isoforms: Evidence for Coordinate Expression During Plant Development and Coordinate Expression During Plant Development and Coordinate Induction in Response to High Salinity. Plant Mol. Biol. v. 39, p. 463 - 475, 1999.

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.

LICHKO, L., OKOROKOV, L. – Purification and Some Properties of Membrane-bound and Soluble Pyrophosphatases of Yeast Vacuoles. Yeast – v. 7, p. 805 – 812, 1991.

- LICHTENTHALER, H.K. – The Stress Concept in Plants: An Introduction In: Plenary Lecture in Stress of Life International Congress of Stress. Budapest – Hungary, 1997. p. 1–5.
- LICHTENTHALER, H.K. – Vegetation Stress: An introduction to the Stress Concept in Plants. J. Plant Physiol. v. 148, p. 4 – 14, 1996.
- LONE, M.I., KUEH, J.S.H., JONES, R.G.W, *et al.* – Influence of Proline and Glycinebetaine on Salt Tolerance of Cultured Barley Embryos. J. Expt. Bot. v. 38, p. 470 – 490, 1987.
- LÖW, R., RAUSCH, T. – In Suspension-cultured *Daucus carota* Cells Salt Stress Stimulates H^+ - Transport but not ATP Hydrolysis of the V-ATPase. Journal of Experimental Botany – v. 47, p. 1725 – 1732, 1996.
- LÖW, R., ROCKEL, B., KIRSH, M., *et al.* – Early Salt Stress Effects on the Differential Expression of Vacuolar H^+ - ATPase Genes in Roots and Leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Physiol. - v. 110, p. 259 – 265, 1996.
- 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.
- LÜTTGE, U., RATAJCZAK, R. – The Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Plant Vacuolar ATPase. Adv. Bot. Res. v. 25, p. 253 – 296, 1997.
- MAAS, E.V. – Crop Salt Tolerance. Agricultural Salinity Assessment and Management (Ed. Tanji, K.K.), Am. Soc. Civil Eng. Manuals and Reports on Engineering Practice, 71, ASCE, New York, p. 262 – 304, 1990.

- MAAS, E.V. – Plant Response to Soil Salinity. In: Productive use and Rehabilitation of Saline Lands. 4th National Conference and Workshop Promaco Conventions. PTY Ltd. Western, Australia, p. 1 – 13, 1996.
- MAAS, E.V., GRIEVE, C.M. Sodium-Induced Calcium Deficiency in Salt-Stressed Corn. Plant Cell Environ. v. 10, p. 559 – 564, 1987.
- MACKIENSE, B.D., LESHEN, Y.A. – Stress and Stress Copin in Cultivated Plants. London: Kluwer Academic Publisher, p. 256, 1994.
- MAESHIMA, M. – Development of Vacuolar Membranes during Elongation of Cells in Mung Bean Hypocotyls. Plant Cell Physiol. v. 31, p. 311 – 317, 1990.
- MAESHIMA, M. – Proton Pumps of the Vacuolar Membrane in Growing Plant Cells. J. Plant Res. v. 109, p. 119 – 125, 1996.
- MAESHIMA, M., NAKANISHI, Y., MATSUURA-ENDO, C, *et al.* – Proton Pumps of the Vacuolar Membrane in Growing Plant Cells. J. Plant Res. v. 109, p. 119 –125, 1996.
- MAESHIMA, M., YOSHIDA, S. – Purification and Properties of Vacuolar Membrane Proton-Translocating Inorganic Pyrophosphatase form Mung Bean. J. Biol Chem. v. 264, p. 20068 – 20073, 1989.
- MAGNIN, T., FRAICHARD, A., TROSSAT, C – The Tonoplast H⁺-ATPase of *Acer pseudoplatanus* is a Vacuolar Type ATPase that Operates with a Phosphoenzyme Intermediate. Plant Physiol. v. 109, p. 285 – 292, 1995.

- MANOLSON, M.F., QUELLETTE, B.F.F., FILION, M. – cDNA Sequence and Homologies of the “57 KDa” Nucleotide-binding Subunit of the Vacuolar ATPase from *Arabidopsis*. J. Biol. Chem. v. 263, p. 17987 – 17994, 1988.
- MARÉCHAL, R., MARCHERPA, J.M., STAINIER, F. – Etude Taxonomique d'un Groupe d'espèces des Genres Phaseolus et Vigna (Papilionaceae) sur la Base Données Morphologiques et Polliniques, Traitées pour l'analyse Informatique. Boissiera, v. 28, p. 1–273, 1978.
- MARIAUX J.B., BECKER A., KEMNA I., *et al.*- Visualization by Freeze – fracture Eletron-microscopy of Intramembranous Particles Corresponding to the Tonoplast H⁺-Pyrophosphatase and H⁺-ATPase of *Kalanchoe-Daigremontiana* Hamet et Perrier de la Bathie. Botanica Acta v. 107 : (5), p. 321 – 327, 1994.
- MARSCHNER, H. – Beneficial Mineral Elements. In: Mineral Nutrition of Higher Plants, Marschner, H. (ed) London: Academic Press, p. 341 – 368, 1986.
- MARTY, F. – Cytochemical Studies on GERL, Provacuoles in Root Meristematic Cells of *Euphorbia*. Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. v. 75, p. 852 – 856, 1978.
- MATSUMOTO, H., CHUNG, G. C. – Increase in Proton-transporte Activity of Tonoplast Vesicles as na Adaptive Response of Barley Roots to NaCl Stress. Plant Cell Physiol. – v. 29, p. 1133 – 1140, 1988.
- MATSUOKA, K., HIGUCHI,T., MAESHIMA, M. – A Vacuolar type H⁺-ATPase in a Nonvacuolar Organelle is Required for the Sorting of Soluble Vacuolar Protein Precursors in Tobacco Cells – The Plant Cell. v. 9, p. 533 – 546, 1997.

- MATSUURA-ENDO C., MAESHIMA, M., YOSHIDA, S. – Subunit Composition of Vacuolar Membrane H⁺-ATPase from Mung Bean. Eur J. Biochem. – v. 187, p. 745 – 751, 1990.
- MATSUURA-ENDO, C., MAESHIMA, M., YOSHIDA, S. – Mechanism, of the Decline in Vacuolar H⁺ - ATPase Activity in Mung Bean Hypocotyls during Chilling. Plant Physiol. – v. 100, p. 718 – 722, 1992.
- MITO, N., KIMURA, T., ASAHI, T. – Partial Purification and Characterization of an ATPase in Mung Bean Hypocotyl Plasma Membrane: Suggestion for a New Type of Higher Plant Plasma Membrane ATPase. Plant Cell Physiol. – v. 29 , p. 875 - 882, 1988.
- MÜLLER, M.L., IRKENS-KIESECKER, U., RUBINSTEIN, B. – On the Mechanism of Hyperacidification in Lemon. J. Biol. Chem. v. 271, p. 1916 – 1924, 1996.
- MUNNS, R., SCHACHTMAN, D.P. – Plant Responses to Salinity: Significance in Relation to Time. In: International Crop Science I. Buxton, D.R., Shibles, R., Forsberg, R.A., Blad, B.L., Asay, K.H., Paulsen, G.M., Wilson, R.F., Eds. Crop Science Society of America, Inc., Madison, WI, USA, p. 741 – 745, 1993.
- NAKAMURA, Y., KASAMO, K., SHIMOSATO, N., *et al.* – Stimulation of the Extrusion of Protons and H⁺ - ATPase Activities with the Decline in Pyrophosphatase Activity of the Tonoplast in Intact Mung Bean Roots under High-NaCl Stress and its Relation to External Levels of Ca⁺ Ions. Plant Cell Physiol. – v. 33, p. 139 – 149, 1992.

- NAKANISHI, Y., MAESHIMA, M. – Molecular Cloning of Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase and its Developmental Expression in Growing Hypocotyl of Mung Bean. Plant Physiol. v. 116, p. 589 – 597, 1998.
- NARASIMHAN, M.L., BINZEL, M.L., PEREZ, *et al.* – NaCl Regulation of Tonoplast ATPase 70 – Kilodalton subunit mRNA in Tobacco Cells. Plant Physiol. v. 97, p. 562 – 568, 1991.
- NELSON, N. – Structure, Function, and Evolution of Proton-ATPases. Plant Physiol. v. 86, p. 0001 – 0003, 1988.
- NOBLE, C.L., ROGERS, M.E. – Arguments for the use of Physiological Criteria for Improving Salt Tolerance in Crops. Plant Soil. v. 146, p. 99 – 107, 1992.
- O'NEILL, S.D., BENNET, A.B., SPANSWICK, R.M. – Characterization of a NO₃⁻ – Sensitive H⁺-ATPase from Corn Roots. Plant Physiol. v. 72, p. 837 – 846, 1983.
- OBERBECK, K., DRUCKER, M., ROBINSON, D. G. – V-ATPase and Pyrophosphatase in Endomembranes of Maize Roots. J. Exp. Bot. v. 45, p. 235 – 244, 1994.
- OBERMEYER, G., SOMMER, A., BENTRUP, F.W. – Potassium and Voltage Dependence of the Inorganic Pyrophosphatase in Intact Vacuoles from *Chenopodium rubrum*. Biochim. Biophys. Acta, v. 1284, p. 203-212, 1996.
- OKOROKOV, L.A., LEHLE, L. (1998) – Ca²⁺-ATPase of *S. cerevisiae*: Diversity and Possible Role in Protein Sorting. FEMS Microbiology Letters. v. 168, p. 83 – 91, 1998.

- PARIS, N., STANLEY, C.M., JONES, R.L. – Plant Cells Contain Two Functionally Distinct Vacuolar Compartments. Cell. v. 85, p. 563 – 572, 1996.
- PARRY, R.V., TURNER, J.C., REA, P.A. – High Purity Preparations of Higher Plant Vacuolar H⁺-ATPase Reveal Additional Subunits. J. Biol. Chem. v. 264, p. 20025 – 20032, 1989.
- PEDERSEN, P.L., CARAFOLI, E. – Ion Motive ATPases. I. Ubiquity, Properties and Significance to the Cell Function. TIBS. v. 12, p. 146 – 150, 1987.
- PHILLIPS, E.P. The Genera of South African Flowering Plants. Pretoria. South Africa: Government Printer, 1951.
- PRISCO, J.T. – Contribuição ao Estudo da Fisiologia do Estresse Salino durante a Germinação e Estabelecimento da Plântula de uma Glicófita (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Tese (Titular de Fisiologia Vegetal. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, 1987).
- PRISCO, J.T., O'LEARY, J.M. – Osmotic and "Toxic" Effects of Salinity on Germination of *Phaseolus vulgaris* L. Seeds. Turrialba, v. 20, p. 177 – 184, 1970.
- REA, P. A., POOLE, R.J. – Vacuolar H⁺-Translocating Pyrophosphatase. Annu. Ver. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. v. 44, p. 157 – 180, 1993.
- REA, P.A, SANDERS, D. – Tonoplast energization: Two H⁺ Pumps, One Membrane. Physiologia Plantarum. v. 71, p. 131 – 141, 1987.

- REA, P.A., KIM, Y., SARAFIAN, V., *et al.* – Vacuolar H⁺-translocating Pyrophosphatases: A New Category of Ion Translocase. Trends Biochem. Sci. v. 17, p. 348 – 353, 1992.
- REA, P.A., LI, Z., LU, Y., *et al.* – From Vacuolar GS-X Pumps to Multispecific ABC Transporters. Annu. Rev. Plant. Physiol. v. 49, p. 727 – 760, 1998.
- REA, P.A., POOLE, R.J. – Proton-translocating Inorganic Pyrophosphatase in Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Tonoplast Vesicles. Plant Physiol. – v. 77, p. 46 – 52, 1985.
- REA, P.A., SANDERS, D. – Tonoplast Energization: Two H⁺-Pumps, One Membrane – Physiol. Plant. v. 82, p. 131 – 141, 1987.
- REUVENI, M., BENNETT, A.B., BRESSAN, R.A. – Enhanced H⁺ Transport Capacity and ATP hydrolysis Activity of the Tonoplast H⁺-ATPase after NaCl Adaptation. Plant Physiol. v. 94, p. 524 – 530, 1990.
- ROBINSON, D.G. – Pyrophosphatase is Not (Only) a Vacuolar Marker. Trends Plant Sci. v. 1, p. 330, 1996.
- ROBINSON, D.G., HINZ, G., OBERBECK, K. – Isolation of Endo- and Plasma Membranes. In: Plant Cell Biology: Practical Approach, N. Harris e K.J. Oparka (ed.). Oxford, U.K.: Oxford University Press. p. 245 – 272, 1994.
- ROCKEL, B., RATAJCZAK, R., BECKER, A. – Changed Densities and Diameters of Intra-membrane Tonoplast Particles of *Mesembryanthemum crystallinum* in correlation with NaCl-induced CAM. J. Plant Biol. v. 143, p. 318 – 324, 1994.

- ROS, R., ROMIEU, C., GIBRAT, R. *et al.* – The Plant Inorganic Pyrophosphatase does not Transport K^+ in Vacuole Membrane Vesicles Multilabeled with Fluorescent Probes for H^+ , K^+ , and membrane Potential. J. Biol. Chem. v. 270, p. 4368-4374, 1995.
- SARAFIAN, V., KIM, Y., POOLE, R.J., REA, P.A. – Molecular Cloning and Sequence of cDNA Encoding the Pyrophosphate-energized Vacuolar Membrane Proton Pump of *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 89, p. 1775 – 1779, 1992.
- SATO, M.H., MAESHIMA, M., OHSUMI, Y. *et al.* – Dimeric Structure of H^+ -Translocating Pyrophosphatase from Pumpkin Vacuolar Membranes. FEBS, v. 290, p. 177 – 180, 1991.
- SHANNON, M.C. – Principles and Strategies in Breeding for Higher Salt Tolerance. Plant and Soil . v. 89, p. 227-241, 1985.
- SHANNON, M.C., GRIEVE, C.M., FRANCOIS, L.E. – Whole-plant Response to Salinity. In: Plant Environment Interactions. R.E. Wilkinson, (ed.). New York: Marcel Dekker. 1994. p. 199 – 244
- SILVA LIMA, M., DENSLOW, N.D., MELO, D.F. - Atractyloside inhibition of adenine nucleotide translocation in mitochondria from hypocotyls of *Vigna sinensis* cv. Seridó. Physiol. Plant., v. 41, p. 193-196. 1977.
- SINGH B.B., MOHAN, RAJ, 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.
- SMYTH, D.A., BLACK, C.C. – Measurement of the Pyrophosphate Content of Plant Tissues. Plant Physiol. v. 75, p. 862 – 864, 1984.
- SZALBOLCS, I. – Soil and Salinization. In: Handbook of Plant and Crop Stress. Mohammad Pessaraki (ed). New York: Marcel Dekker, Inc. 1994.
- SZE, H, LI, X, PALMGREN, M.G. – Energization of Plant Cell Membranes by H⁺-Pumping ATPases: Regulation and Biosynthesis – The Plant Cell, v. 11, p. 677 – 689, 1999.
- SZE, H., WARD, J.M., LAI, S., PERERA, I. – Vacuolar Type H⁺-Translocating ATPase in Plant Endomembranes: Subunit Organization and Multigene Families. J. Exp. Biol. v. 172, p. 123 – 136, 1992.
- TAIZ, L. – The Plant Vacuole. J. Exp. Biol. v. 172, p. 113 – 112, 1992.
- TAIZ, L. – Vacuolar Transport in Plants – In: V Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal – Lavras – Mg – 1995.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. – Plant Physiology, - Benjamin/Cummings (ed.) Redwood City: Publishing Co., Inc. 1991. p. 559
- TAKASU, A., NAKANISHI, Y., YAMAUCHI, T – Analysis of the Substrate Binding Site and Carboxyl Terminal Region of Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase of Mung Bean with Peptide Antibodies. J. Biochem. – v. 122, p. 883 – 889, 1997.

- TAKESHIGE, K., TAZAWA, M. – Determination of the Inorganic Pyrophosphate Level and its Subcellular Localization in *Chara corallina*. J. Biol. Chem. v. 264, p. 3262 – 3266, 1989.
- UNGAR, I.A. – Halophyte Seed Germination. Bot. Rev., v. 44, p. 233 – 264, 1978.
- VERDCOURT, B. 1970. Studies in the Leguminosae Papilonoideae for the Flora of Tropical East Africa. IV. Kew Bulletin, v. 24, p. 507-569, 1970.
- VINCENTE, J.A.F., VALE, M.G.P. – Proton Transport by a Fraction of Endoplasmic Reticulum and Golgi Membranes of Corn Roots – Comparison with the Plasma Membrane and Tonoplast H⁺-Pumps. Plant Science. v. 93, p. 1063 – 1070, 1994.
- WALKER, R.R., LEIGH, R.A. – Mg²⁺-dependent, Cation-stimulated Inorganic Pyrophosphatase Associated with Vacuoles of Red Beet (*Beta vulgaris* L.) – Planta – v. 153, p. 150 – 155, 1981.
- WANG, Y., LEIGH, R.A., KAESTNER, K.H. – Eletrogenic H⁺ -Pumping Pyrophosphatase in Tonoplast Vesicles of Oat Roots. Plant Physiol. v. 81, p. 497 – 502, 1986.
- WARD, J.M., SZE, H. – Proton Transport Activity of the Purified Vacuolar H⁺ - ATPase from Oats. Plant Physiol. v. 99, p. 925 – 931, 1992.
- WATAD, A. E. A., PESCI, P.A., REINHOLD, L., *et al.* – Proton Fluxes as a Response to External Salinity in Wild Type and NaCl-Adapted *Nicotiana* Cell Lines. Plant Physiol. v. 81, p. 454 – 459, 1986.

- WEINER, H., STITT, M., HELDT, H.W. – Subcellular Compartmentation of Pyrophosphate and Alkaline Pyrophosphatase in Leaves. Biochem. Biophys. Acta – v. 893, p. 13 – 21, 1987.
- WHITE, P.J. – Bafilomycin – A₁ is a Non-Competitive Inhibitor of the Tonoplast H⁺ - ATPase of Maize Coleoptiles. Journal of Experimental Botany – v. 45, p. 1397 – 1402, 1994.
- WIEN, H. C., SUMMERFIELD, R. J. – COWPEA (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) In: The Physiology of Tropical Field Crops. New York, EE.UU.: John Wiley & Sons, 1984, p. 353-383.
- WYN JONES, R.G. – Salt Tolerance. In: Physiological Processes Limiting Plant Productivity. C.B. Johnson, (Ed.). Great Britain: Butterworths, 1981. p. 271 – 292
- ZIMNIAC, L., DITTRICH, P., GOGARTEN, J.P., *et al.* – The cDNA Sequence of the 69 KDa Subunit of the Carrot Vacuolar H⁺-ATPase. Homology to the β -Chain of F₀F₁-ATPases. J. Biol. Chem. v. 263, p. 9102 – 9112, 1988.
- ZINGARELLI, L., ANZANI, P., LADO, P. – Enhanced K⁺- Stimulated Pyrophosphatase Activity in NaCl-adapted Cells of *Acer pseudoplatanus* – Physiol. Plant. – v. 91, p. 510 – 516, 1994.