



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

**SINCRONIA ENTRE CATALASES E PEROXIDASES DE ASCORBATO NA  
PROTEÇÃO CONTRA DANOS OXIDATIVOS EM FOLHAS DE FEIJÃO CAUPI  
EXPOSTAS AOS ESTRESSES HÍDRICO E SALINO**

**JOÃO PAULO MATOS SANTOS LIMA**

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2007**



**SINCRONIA ENTRE CATALASES E PEROXIDASES DE ASCORBATO NA  
PROTEÇÃO CONTRA DANOS OXIDATIVOS EM FOLHAS DE FEIJÃO CAUPI  
EXPOSTAS AOS ESTRESSES HÍDRICO E SALINO.**

**JOÃO PAULO MATOS SANTOS LIMA**

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2007**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Azevedo U. Melo, CRB-3/572.

L698s Lima, João Paulo Matos Santos

Sincronia entre Catalases e Peroxidases de Ascorbato na proteção contra danos oxidativos em folhas de feijão caupi expostas aos estresses hídricos e salino / João Paulo Matos Santos Lima.

155f., il. color. enc.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

1. *Vigna unguiculata* 2. Estresse oxidativo 3. APX 4. CAT 5. Aminotriazole I. Silveira, Joaquim Albenísio Gomes da (orient.)  
II. Universidade Federal do Ceará – Pós Graduação em Bioquímica  
III. Título

CDD 574. 192

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

A transcrição de qualquer trecho dessa Tese será permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da Ética Científica.

Tese aprovada em 3 de Julho de 2007.

João Paulo Matos Santos Lima  
Biólogo, M.Sc.

Dr. Joaquim ~~Albenísio~~ Gomes da Silveira  
UFC/DBBM - Orientador

Prof. Benildo Sousa Cavada, Dr.  
UFC/DBBM - Conselheiro

José Hélio Costa, Dr.  
UFC/DBBM - Conselheiro

Profa. Márcia ~~Maria A.~~ N. Pinheiro Margis, Dra.  
UFRGS - Conselheira

Prof. Fábio Rossi Cavalcanti, Dr.  
UFPI - Conselheiro

**A meus Pais,**

**Vicente Maia e Lúcia,**

**Que nunca mediram esforços  
quando a questão era a educação  
dos filhos...**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida e pela vida das pessoas que me cercam, por sua onisciência e onipresença em cada momento de minha caminhada.

Ao Prof. Dr. Joaquim Albenísio G. Silveira, por sua orientação, seus ensinamentos e conselhos, paciência, amizade, pela enorme confiança na realização deste estudo. E principalmente por não medir esforços para proporcionar uma infra-estrutura adequada de trabalho ao seu grupo.

Ao Prof. Dr. Fábio Rossi Cavalcanti, pela grande amizade, incentivos, conselhos, confiança e pela inestimável ajuda em vários momentos de convivência. Uma pessoa pela qual tenho uma imensa admiração.

Ao Prof. Benildo S. Cavada, por seus incentivos e conselhos em vários momentos, e por sua disponibilidade em participar na avaliação deste trabalho. Por sua dedicação ao desenvolvimento da ciência em nossa região.

Ao Dr. José Hélio Costa, por seus conselhos, ensinamentos, e principalmente por sua enorme contribuição e ajuda imprescindíveis na realização do presente trabalho.

A Profa. Dra. Márcia Margis-Pinheiro, por sua disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho, propondo sugestões.

Ao Prof. Rodrigo Maranguape, um grande amigo, pelo grande exemplo profissional e pessoal, por sua valiosa contribuição neste trabalho e por ter aberto as portas de seu laboratório para a realização de experimentos.

Ao Prof. Dr. Thalles B. Grangeiro, por todos seus ensinamentos e conselhos científicos que contribuíram na minha formação.

A Prof. Dra. Dirce Melo, pelo seu apoio e conselhos em diversas ocasiões.

Aos Professores José Tadeu Abreu de Oliveira e Francisco Campos por seus preciosos ensinamentos e conselhos científicos.

Ao Prof. Valdinar Custódio (*In Memoriam*), pela sua orientação e amizade. Por ter me iniciado no mundo da ciência e no estudo da maravilhosa obra do acaso que é a vida.

Aos amigos, Sérgio Luiz Ferreira Silva e Eduardo Voigt, por seus exemplos de postura científica e profissional. Pela indispensável ajuda nos experimentos e pelas agradáveis e proveitosas discussões científicas.

Aos bolsistas de iniciação científica, Adílton Vasconcelos e Marcelo Brito, pela enorme e valiosa ajuda no preparo de material, condução e montagem dos experimentos na casa de vegetação, assim como em inúmeras determinações experimentais.

A todos os companheiros de trabalho no Laboratório de Metabolismo de Plantas (LABPLANT), Josemir Maia, Luiz Aguiar, Theresa Christine, Rafael Aragão, Tathiane, Abel,

Edinilda (Nega), Dr. Batista, Lucilene, Iza, por sua cooperação, convivência e preciosa ajuda na elaboração deste trabalho.

A todos do Laboratório de Genética do Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS, em especial a Auxiliadora, Ricardo e Monalisa.

A todos do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, em especial a Hévila, Simone e Betânia.

Agradeço de maneira especial,

Aos meus pais, por seu amor, confiança, paciência e dedicação incondicionais em todos os momentos de minha vida. Duas pessoas exemplares que estão sempre torcendo por minha felicidade e sucesso.

Às minhas irmãs Ana Paula e Luciana, minhas melhores amigas, por dividirem comigo os melhores momentos de minha vida e estarem presentes em todos os piores.

A Clarissa Magalhães, por sua presença na minha vida e por sempre acreditar em mim, mesmo nas horas em que eu mesmo deixava de acreditar.

Aos grandes amigos, Carlos Augusto, Marcello Renatto, Profa. Cristina Paiva, Lívio Gurjão e Daniele, Daniel Macedo, Delano Cidrack e Alessandro Varani, pela força e ajuda dada em inúmeras situações.

A todos que de algum modo me ajudaram neste trabalho.

**ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXÍLIO DAS  
SEGUINTE INSTITUIÇÕES:**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos e taxa de bancada durante o período de março de 2003 até fevereiro de 2007.

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa – FUNCAP.

Universidade Federal do Ceará (UFC).

Núcleo de Biotecnologia de Sobral - NUBIS



*"Se não procurares senão a recompensa, o  
trabalho vai parece-te penoso: mas, se  
apreciares o trabalho por si mesmo, nele próprio  
terás a tua recompensa"*

**Leon Tolstói**

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</b> .....	xvii
<b>RESUMO</b> .....	xviii
<b>ABSTRACT</b> .....	xix
<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	1
1.1. Conceitos e Terminologias.....	1
1.1.1. A noção de Estresse e Restrição.....	1
1.1.2. A Resistência e a Tolerância ao Estresse.....	2
1.1.3. A resposta das plantas aos estresses abióticos.....	3
1.2. O Estresse Hídrico.....	6
1.2.1. A Definição de Seca.....	6
1.2.2. Áreas Afetadas pela Seca no Mundo e no Brasil.....	6
1.2.3. Resistência das Plantas à Seca.....	9
1.2.4. Respostas Fisiológicas das Plantas ao estresse hídrico.....	11
1.3. O Estresse Salino.....	14
1.3.1. O crescente problema da Salinidade.....	14
1.3.2. Mecanismos Fisiológicos de resposta das plantas ao Estresse Salino.....	17
1.4. Sinalização Metabólica nos Estresses Hídrico e Salino.....	21
1.4.1. Percepção e Transdução de Sinais Ambientais.....	21
1.5. O Estresse Oxidativo nos Vegetais.....	22
1.5.1. Espécies Ativas de Oxigênio (AOS).....	22
1.5.2. Sítios de Produção de Espécies Ativas de Oxigênio.....	25
1.5.3. Mecanismos de Defesa Antioxidativa da Célula Vegetal.....	28
1.5.4. Redundância e troca de informações entre os mecanismos antioxidantes enzimáticos.....	32
1.6. O Modelo Vegetal.....	35
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	37
<b>3. HIPÓTESES</b> .....	39
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	40
<b>5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b> .....	41
5.1. Material Vegetal.....	43
5.2. Obtenção das Plantas.....	44
5.3. Coleta e Processamento do Material.....	44
5.4. Análises Estatísticas.....	44
5.5. Experimento I.....	46
5.6. Experimento II.....	47
5.7. Experimento III.....	48
<b>6. METODOLOGIA</b> .....	50
6.1. Taxas de Transpiração e Condutância Estomática.....	50
6.2. Conteúdo Relativo de Água (C.R.A.).....	50
6.3. Determinação do Percentual de Umidade (%Umidade).....	50
6.4. Determinação da Osmolalidade (Osm) e do Potencial Osmótico ( $\Psi_s$ ) dos Tecidos foliares.....	51
6.5. Concentração de $\text{Na}^+$ de tecidos foliares.....	51
6.6. Peroxidação de Lipídeos (TBARS).....	51
6.7. Determinação do Conteúdo de Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).....	52
6.8. Determinação do Conteúdo de Ascorbato Reduzido.....	53
6.9. Extração enzimática de tecidos foliares.....	53

6.10. Atividade total de Dismutases de Superóxidos (SOD).....	54
6.11. Atividade das Peroxidases de Ascorbato (APX).....	54
6.12. Atividade de Catalases (CAT).....	55
6.13. Géis de atividade enzimática da Enzima Catalase (Zimograma de CAT).....	55
6.14. Desenho do Peptídeo para reconhecimento das isoformas da enzima CAT.....	55
6.15. Indução e Preparo dos Anticorpos.....	56
6.16. Imunoblot de Proteínas (Western Blot).....	57
6.17. Desenho dos Iniciadores específicos para os genes da CAT e cAPX.....	57
6.18. Extração de RNA Total de tecidos foliares de feijão caupi.....	58
6.19. Eletroforese de RNA em condições não-desnaturantes.....	60
6.20. Síntese da primeira fita de cDNA.....	60
6.21. Análise da Expressão dos mRNAs por RT-PCR Quantitativo.....	61
<b>7. RESULTADOS</b> .....	62
7.1. Experimento I.....	62
7.2. Experimento II.....	74
7.3. Experimento III.....	92
<b>8. DISCUSSÃO</b> .....	110
8.1. Influência dos Estresses Hídrico e Salino nos Indicadores fisiológicos de Estresse de Plantas de <i>Vigna unguiculata</i> .....	110
8.2. Efeitos tempo-dependente do PEG sobre o sistema antioxidante de tecidos foliares.....	112
8.3. Efeitos da ausência do sistema antioxidante enzimático da CAT induzido pela aplicação do 3-AT.....	115
<b>9. SÍNTESE E CONCLUSÃO FINAL</b> .....	120
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	121

## LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1 – Tamanho das Áreas Secas no Mundo, na América do Sul e no Território Brasileiro ( $10^3$ km <sup>2</sup> ) (Valores Retirados de Le Houérou, 1996).....	8
TABELA 2 – Definição dos solos salinos e sódicos, classificados de acordo com o Laboratório de Salinidade do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USSL – USDA). Adaptado de Munns (2005).....	16
TABELA 3 – Composição da Solução Nutritiva utilizada. O pH final da solução utilizada foi ajustado para 6,0.....	45
TABELA 4 – Potencial osmótico das diferentes soluções nutritivas contendo NaCl e PEG.....	45
TABELA 5 – Descrição dos iniciadores utilizados para as reações de RT-PCR Quantitativo.....	59
TABELA 6 – Condições térmicas utilizadas nas Reações de RT-PCR Quantitativo, para os mRNAs das enzimas Catalase e Ascorbato Peroxidase.....	59
TABELA 7 – Indicadores Fisiológicos do Experimento II (PEG x 3-AT) em condições de câmara de crescimento e de casa de vegetação após 72 h de tratamento. % Umidade, Conteúdo Relativo de Água (C.R.A.) e Potencial Osmótico do exsudato celular total de tecidos foliares de plantas de <i>V. unguiculata</i> .....	76
TABELA 8 – Indicadores Fisiológicos obtidos no Experimento III (NaCl x 3-AT) em condições de câmara de crescimento e de casa de vegetação após 72 h de tratamento. % Umidade, Conteúdo Relativo de Água (C.R.A.) e Potencial Osmótico do exsudato celular total de tecidos foliares de plantas de <i>V. unguiculata</i> .....	97

## LISTA DAS FIGURAS

	Página
FIGURA 1 – Fatores que afetam a resposta das plantas aos estresses ambientais. Adaptado de Bray <i>et al.</i> (2000).....	5
FIGURA 2 – Regiões Climáticas do Globo Terrestre. Fonte: Global Agro-ecological Zones (FAO – IIASA, 2000).....	8
FIGURA 3 – Distribuição dos Solos Salinos no Mundo. As diferentes cores indicam valores aproximados de porcentagem do total de cada área atingida pela salinidade (em km <sup>2</sup> ). Adaptado de FAO (2005).....	15
FIGURA 4 – Distribuição dos Solos Salinos no Mundo. As diferentes cores indicam valores aproximados de porcentagem do total de cada área atingida pela salinidade (em km <sup>2</sup> ). Adaptado de FAO (2005).....	15
FIGURA 5 – Gráfico esquemático das 2 fases da resposta do crescimento das plantas sob o efeito da salinidade. O tempo (Dias a semanas), representando aqui uma espécie anual, depende da espécie de planta, do tipo de substrato e de parâmetros ambientais como luminosidade e temperatura. Adaptado de Munns (2005).....	19
FIGURA 6 – Geração das diferentes AOS por transferência de energia ou reduções sequenciais univalentes do Oxigênio triplet no estado basal. (Adaptado de Apel & Hirt, 2004).....	24
FIGURA 7 – Reações de Fenton ou Haber-Weiss.....	24
FIGURA 8 – O ciclo Ascorbato-Glutationa. (Adaptado de Inzé & Van Montagu, 1995).....	29
FIGURA 9 – Fórmula estrutural do inibidor de CAT, 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) utilizado no presente estudo.....	43
FIGURA 10 – Aspecto Visual das plantas de <i>Vigna unguiculata</i> cv. "Pitiúba", 48 h após a aplicação do tratamento de estresse. (A) Plantas mantidas em condições controladas de câmara de crescimento; (B) Plantas mantidas nas condições de casa de vegetação.....	63
FIGURA 11 – Taxas de transpiração e Resistência Estomática (RE) das plantas Controle (O) e submetidas a estresse hídrico induzido por PEG (●), nas condições de casa de vegetação. Os dados representam médias ±desvio padrão de 4 plantas.....	64
FIGURA 12 – (A), (C) Conteúdo Relativo de Água (CRA) e (B), (D) % Umidade das plantas, em condições controladas de câmara de crescimento e em condições de casa de vegetação, respectivamente. (O) representa as plantas Controle e (●) as submetidas a estresse hídrico induzido por PEG. Os dados representam médias ±desvio padrão de 3 plantas.....	66
FIGURA 13 – Potencial Osmótico das plantas Controle (O) e submetidas a estresse hídrico induzido por PEG (●), em: (A) condições controladas de câmara de crescimento; e (B) em condições de casa de vegetação. Os dados representam médias ±desvio padrão de 3 plantas.....	67
FIGURA 14 – (A), (C) Peroxidação de Lipídeos (TBARS) e (B), (D) Conteúdo de Ascorbato Reduzido (AsARed.), em condições controladas de câmara de crescimento e em condições de casa de vegetação, respectivamente. (O) representa as plantas Controle e (●) as submetidas a estresse hídrico induzido por PEG. Os dados representam médias ±desvio padrão de 3 plantas.....	68
FIGURA 15 – Proteínas Solúveis Totais das plantas Controle (O) e submetidas a estresse hídrico induzido por PEG (●), em: (A) condições controladas de câmara de crescimento; e (B) em condições de casa de vegetação. Os dados representam médias ±desvio padrão de 3 plantas.....	70
FIGURA 16 – Atividade de Dismutases de Superóxidos (SOD). (A) Atividade na base de Massa Seca e (B) Atividade na base de Proteínas, em condições controladas de câmara de crescimento. (C) Atividade na base de Massa Seca e (D) Atividade na base de Proteínas em condições de casa de vegetação. (O) representam as plantas Controle e (●) as submetidas a estresse hídrico induzido por PEG. Os dados representam médias ±desvio padrão de 3 plantas.....	71

- FIGURA 17 – Atividade de Peroxidases de Ascorbato (APX). (A) Atividade na base de Massa Seca e (B) Atividade na base de Proteínas, em condições controladas de câmara de crescimento. (C) Atividade na base de Massa Seca e (D) Atividade na base de Proteínas em condições de casa de vegetação. (○) representam as plantas Controle e (●) as submetidas a estresse hídrico induzido por PEG. Os dados representam médias  $\pm$ desvio padrão de 3 plantas..... 72
- FIGURA 18 – Atividade de Catalases (CAT). (A) Atividade na base de Massa Seca e (B) Atividade na base de Proteínas, em condições controladas de câmara de crescimento. (C) Atividade na base de Massa Seca e (D) Atividade na base de Proteínas em condições de casa de vegetação. (○) representam as plantas Controle e (●) as submetidas a estresse hídrico induzido por PEG. Os dados representam médias  $\pm$ desvio padrão de 3 plantas..... 73
- FIGURA 19 – Sintomatologia tempo-dependente da aplicação exógena por pulverização do 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT). (A) 8 horas após a 1ª Aplicação: são observadas pequenas regiões de leve clorose, com mudanças na textura do tecido; (B) Entre 24h e 30h: aparecimento de regiões de necrose isoladas; (C) Entre 48 e 72 h: expansão das regiões necrosadas às extremidades da folha; (D) Sintomas da aplicação de 3-AT em combinação com o tratamento de PEG 17,84%, nas condições de casa de vegetação, 48 h após o início do experimento: dessecamento do tecido foliar, associado à intensa clorose e a expansão de regiões de necrose, das extremidades para a nervura..... 75
- FIGURA 20 – (A) Peroxidação de Lipídeos (TBARS) e (B) Conteúdo de Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (■) e de Casa de Vegetação (□), respectivamente. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )..... 78
- FIGURA 21 – (A) Conteúdo de Ascorbato Reduzido ( $AsA_{Red.}$ ) e (B) Proteínas Solúveis Totais de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (■) e de Casa de Vegetação (□), respectivamente. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )..... 79
- FIGURA 22 – Atividade Enzimática de Dismutases de Superóxido (SODs) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (A) e de Casa de Vegetação (B). Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )..... 80
- FIGURA 23 – Atividade Enzimática da Catalase (CAT) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento. (A) Atividade em Gel (Zimograma). (B) Atividade in vitro. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade

- ( $p < 0,05$ )..... 82
- FIGURA 24 – Atividade Enzimática da Catalase (CAT) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Casa de Vegetação. (A) Atividade em Gel (Zimograma). (B) Atividade in vitro. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )..... 83
- FIGURA 25 – Atividade Enzimática de Peroxidases de Ascorbato (APXs) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (A) e de Casa de Vegetação (B). Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )..... 84
- FIGURA 26 – (A) SDS-PAGE de proteínas de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de câmara de crescimento (poços A-D) e de Casa de Vegetação (poços E-H). M – Marcador de Peso Molecular. Foram aplicados 20  $\mu$ L do extrato de proteínas solúveis totais ( $\approx 40 \mu$ g) por poço. Câmara de Crescimento: A – Amostras Controle; B – Amostras tratadas com PEG 17,84%; C – Amostras tratadas com PEG 17,84% e 3-AT 10 mM; D – Amostras apenas tratadas com 3-AT. Casa de Vegetação: E – Controle; F – PEG 17,84%; G – PEG 17,84% + 3-AT 10 mM; H – 3-AT. (B) Imunoblot de catalases, nas amostras acima relatadas, utilizando o peptídeo sintético produzido a partir do alinhamento de seqüências primárias de CATs provenientes de outras espécies..... 85
- FIGURA 27 – (A) Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *cat* e *ef1 $\alpha$*  (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao CT (B) Curva de desnaturação dos fragmentos amplificados, relativo à amostra Controle..... 87
- FIGURA 28 – Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *cat* e *ef1 $\alpha$*  (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Casa de Vegetação. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao CT..... 88
- FIGURA 29 – (A) Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *cApx* e *ef1 $\alpha$*  (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao CT (B) Curva de desnaturação dos fragmentos amplificados, relativo à amostra Controle..... 89
- FIGURA 30 – Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *cApx* e *ef1 $\alpha$*  (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Casa de Vegetação. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao CT..... 90
- FIGURA 31 – Nível de expressão dos transcritos do gene para a enzima CAT (A) e para a enzima cAPX normalizados com o nível de expressão dos transcritos do gene constitutivo *ef1 $\alpha$*  (gene constitutivo), por RT-PCR

- quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de crescimento (■) e de Casa de Vegetação (□), respectivamente..... 91
- FIGURA 32 – (A) Aspecto Visual das plantas de *Vigna unguiculata* cv. Pitiúba, mantidas nas condições de casa de vegetação, no dia da coleta (72 h após a aplicação dos tratamentos de estresse). Sintomatologia da aplicação exógena por pulverização do 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) em combinação com o tratamento de NaCl (NaCl+AT): 48 h (B) e 72 h (C) após a aplicação dos tratamentos, nas condições de casa de vegetação..... 93
- FIGURA 33 – (A) Taxas de transpiração e (B) Resistência Estomática (RE) de plantas de *V. unguiculata* submetidas a tratamento Controle (O) e a estresse hídrico induzido por PEG (●), nas condições de casa de vegetação. Os dados representam médias  $\pm$ desvio padrão de 4 plantas. (C) Conteúdo de Na<sup>+</sup> em tecidos foliares de plantas cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (■) e de Casa de Vegetação (□), respectivamente. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 Vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )..... 94
- FIGURA 34 – (A) Peroxidação de Lipídeos (TBARS) e (B) Conteúdo de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (■) e de Casa de Vegetação (□), respectivamente. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )..... 98
- FIGURA 35 – (A) Conteúdo de Ascorbato Reduzido (AsARed.) e (B) Proteínas Solúveis Totais de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (■) e de Casa de Vegetação (□), respectivamente. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )..... 99
- FIGURA 36 – Atividade Enzimática de Dismutases de Superóxido (SODs) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (A) e de Casa de Vegetação (B). Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )..... 100
- FIGURA 37 – Atividade Enzimática da Catalase (CAT) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento. (A) Atividade em Gel (Zimograma). (B) Atividade in vitro. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )..... 101
- FIGURA 38 – Atividade Enzimática da Catalase (CAT) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Casa de Vegetação. (A) Atividade em Gel (Zimograma). (B) Atividade in vitro. Valores são



- médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )..... 102
- FIGURA 39 – Atividade Enzimática de Peroxidases de Ascorbato (APXs) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (A) e de Casa de Vegetação (B). Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ )..... 103
- FIGURA 40 – (A) SDS-PAGE de proteínas de tecidos foliares de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de câmara de crescimento (poços A-D) e de Casa de Vegetação (poços E-H). M – Marcador de Peso Molecular. Foram aplicados 20  $\mu$ L do extrato de proteínas solúveis totais ( $\approx 40 \mu$ g) por poço. Câmara de Crescimento: A – Amostras Controle; B – Amostras tratadas com NaCl 100 mM; C – Amostras tratadas com NaCl 100 mM e 3-AT 10 mM; D – Amostras apenas tratadas com 3-AT. Casa de Vegetação: E – Controle; F – NaCl 100 mM; G – NaCl 100 mM + 3-AT 10 mM; H – 3-AT. (B) Imunoblot de catalases, nas amostras acima relatadas, utilizando o peptídeo sintético produzido a partir do alinhamento de seqüências primárias de CATs provenientes de outras espécies..... 104
- FIGURA 41 – (A) Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *cat* e *ef1 $\alpha$*  (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao CT. (Ver Estratégia Experimental). 105
- FIGURA 42 – Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *cat* e *ef1 $\alpha$*  (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Casa de Vegetação. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao CT..... 106
- FIGURA 43 – (A) Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *cApx* e *ef1 $\alpha$*  (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao CT..... 107
- FIGURA 44 – Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *cApx* e *ef1 $\alpha$*  (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Casa de Vegetação. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao CT..... 108
- FIGURA 45 – Nível de expressão dos transcritos do gene para a enzima CAT (A) e para a enzima cAPX normalizados com o nível de expressão dos transcritos do gene constitutivo *ef1 $\alpha$*  (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de crescimento (■) e de Casa de Vegetação (□), respectivamente..... 109

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

% Umidade	Porcentagem de Umidade de Tecido
$\psi_w$	Potencial hídrico
$\psi_s$	Potencial Osmótico
$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singlet
ABA	Ácido Abscísico
AOS	Espécies Ativas de Oxigênio
APX	Peroxidase de Ascorbato
AsA	Ácido Ascórbico
AsA <sub>Red</sub>	Ascorbato Reduzido
ATP	Trifosfato de Adenosina
BSA	Albumina Sérica Bovina
APX	Peroxidase de Ascorbato
CAT	Catalase
<i>cat</i>	Gene de Catalase
<i>cApX</i>	Gene da APX citossólica
<i>ef1<math>\alpha</math></i>	Gene do fator de alongação 1- $\alpha$
Cl <sup>-</sup>	Íon Cloreto
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CRA	Conteúdo Relativo de Água
CTE	Cadeia de Transporte de elétrons
DHA	Dehidroascorbato
DHAR	Monodehidroascorbato
DTT	Ditiotreitól
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
Fd	Ferredoxina
N <sub>2</sub> líq.	Nitrogênio Líquido
Na <sup>+</sup>	Íon sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NaOH	Hidróxido de sódio
PAGE-SDS	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS
PEG	PolietilenoGlicol
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Dismutases de Supereóxidos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido Ribonucléico
mRNA	RNA mensageiro
RT	Transcriptase Reversa
PCR	Reação em cadeia da DNA Polimerase
Osm	Osmolalidade

# SINCRONIA ENTRE CATALASES E PEROXIDASES DE ASCORBATO NA PROTEÇÃO CONTRA DANOS OXIDATIVOS EM FOLHAS DE FEIJÃO CAUPI EXPOSTAS AOS ESTRESSES HÍDRICO E SALINO

**Autor:** João Paulo Matos Santos Lima

**Orientador:** Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

## RESUMO

O estresse hídrico induzido por seca ou salinidade é a principal restrição ambiental à sobrevivência das plantas e sustentabilidade das culturas, principalmente nas regiões semi-áridas, onde estão frequentemente associados a altas temperaturas e taxas de luminosidade. Uma grande parte dos efeitos destes estresses ambientais no metabolismo das plantas é mediada por danos oxidativos devido ao aumento na produção de espécies ativas de oxigênio (AOS). O presente estudo se propôs a estudar a interação e a importância dos sistemas antioxidantes enzimáticos da catalase (CAT) e da peroxidase de ascorbato (APX) na proteção dos tecidos foliares de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] contra os danos oxidativos induzidos por condições de deficiência hídrica e salinidade. Para isso, foi utilizada uma abordagem experimental envolvendo 3 experimentos, utilizando combinações de estresse hídrico, induzido por polietilenoglicol (PEG), ou salino, induzido por NaCl, com a pulverização do inibidor de catalases 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT). Estes experimentos foram, ainda, realizados em duas condições ambientais: uma em câmara de crescimento sob condições controladas e em casa de vegetação, sob condições típicas do semi-árido. O PEG e o NaCl foram aplicados na solução nutritiva durante 72 h, e o 3-AT pulverizado diariamente na parte aérea. O estresse osmótico causado pela aplicação de PEG ou de NaCl induziu uma forte redução na transpiração, associada a uma maior resistência estomática, e uma acentuada redução no crescimento nas plantas submetidas as condições de casa de vegetação. Houve um considerável aumento na peroxidação de lipídeos e do conteúdo do antioxidante ascorbato das plantas tratadas, bem como uma diminuição da atividade de CAT. As plantas submetidas a uma combinação de estresse osmótico e a aplicação do 3-AT apresentaram um acentuado aumento da atividade da enzima APX, compensando, em parte a ausência da atividade da enzima CAT. Esta diminuição da atividade enzimática de CAT foi acompanhada por uma forte repressão dos mRNAs para esta enzima, enquanto que houve uma indução dos mRNAs da APX citossólica. Estes resultados indicam que há uma controlada sincronia entre a expressão e a atividade enzimática destes dois sistemas, na regulação e desintoxicação das AOS produzidas na célula vegetal, durante situações de estresse ambiental.

**Palavras-chave:** *Vigna unguiculata*, estresse oxidativo, APX, CAT, aminotriazole.

# SYNCHRONY BETWEEN CATALASES AND ASCORBATE PEROXIDASES IN COWPEA LEAVES PROTECTION AGAINST THE WATER AND SALT STRESS-INDUCED OXIDATIVE DAMAGE

**Author: João Paulo Matos Santos Lima**

**Adviser: Joaquim Albenísio Gomes da Silveira**

## ABSTRACT

Water stress, induced by drought or salinity, is the major environmental restriction to plant survive and crop sustainability, specially in semi-arid areas, where they are often associated to high temperatures and high radiation rates. Part of the effects exerted by these abiotic stresses on plant metabolism is mediated by oxidative damage due to an increased production of active oxygen species (AOS). The present study aims to elucidate the interactions and the importance of the catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) enzymatic antioxidants systems in the protection of cowpea leaf tissues [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] against the oxidative damage induced by water deficit and salinity. The experimental approach adopted, involved 3 different experiments, using PEG-induced water stress or NaCl-induced salt stress, combined to the CAT inhibitor 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT) application. These experiments were conducted under two environmental conditions: in a growth chamber, under controlled conditions, and in a greenhouse, under the typical semi-arid conditions of the Brazilian Northeast. PEG and NaCl treatments were applied to the nutritive solution for 72 h, while the 3-AT was daily sprayed in the shoot. The osmotic stress induced by PEG or NaCl caused acute declines in the transpiration rates, due to increase in stomatal resistance, as well as an intense growth reduction, in the plants cultivated in the greenhouse conditions. The osmotic stressed plants presented significant increases on lipid peroxidation and on the ascorbate content, in addition to a CAT activity reduction. The osmotic stress and 3-AT combination raised the APX activity levels that counteracted, at least in part, the CAT absence. The fall in the CAT activity was related to a strong mRNA expression restraint, followed by an up-regulation of the cytosolic APX mRNA. These results indicate the presence of a controlled synchrony between the expression and enzymatic activity of these antioxidant systems, in the regulation and detoxification of the AOS produced in plant cells, during environmental stresses situations.

**Keywords:** cowpea, oxidative stress, APX, CAT, aminotriazole.

# 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1. Conceitos e Terminologias

### 1.1.1. A noção de Estresse e Restrição

Em um sentido físico, estresse (do inglês *stress*) é uma força ou sistema de forças que tende a pressionar ou deformar um determinado corpo ou objeto<sup>1</sup>. Quando utilizado em um sentido biológico, tal termo tem várias conotações, sendo, portanto, difícil de se definir (Jones & Jones, 1989; Mahajan & Tuteja, 2005). Lutts (1996) considera como estresse o conjunto das perturbações metabólicas provocadas em certo organismo por variados agentes agressores. No entanto, Levitt (1980) define o estresse como um agente agressor em si, um fator ambiental que induz uma restrição, uma limitação, no sentido de sobrevivência, potencialmente maléfica sobre um organismo vivo.

Larcher (2000) define como estresse ambiental, um estado em que a demanda de energia pela planta para sua sobrevivência é maior que a produção, o que leva a uma desestabilização inicial de suas funções, seguida por uma normalização e indução dos processos fisiológicos de adaptação. O estresse teria, portanto, elementos construtivos e destrutivos, sendo um fator de seleção e uma força motriz para o incremento da tolerância e evolução adaptativa da planta (Pimentel, 2004). Um estresse pode ativar o metabolismo celular e aumentar a atividade fisiológica da planta, sem causar nenhum dano, mesmo a longo prazo, sendo, portanto, favorável à planta.

Muitos autores afirmam que uma das principais dificuldades no estudo dos efeitos dos estresses abióticos nos vegetais é inerente à noção de restrição (Taiz & Zieger, 2004). No caso de um estresse aplicado em um organismo vivo, a natureza exata da restrição é freqüentemente difícil de determinar e a relação entre intensidade do estresse e importância da restrição está longe de ser simples. Isso é particularmente verdade no caso de estresses abióticos que geralmente apresentam inúmeros componentes e induzem múltiplas restrições (Lutts, 1996).

Ainda segundo Lutts (1996), a restrição é difícil de ser quantificada, em contrário ao estresse que pode ser mensurado no meio externo ou à resposta da planta, que pode ser determinada pelo fisiologista no laboratório. Então, uma pertinente pergunta surge: duas plantas que apresentam respostas diferentes a um mesmo estresse responderam de forma diferente a uma mesma restrição interna ou o estresse induziu em cada uma delas restrições

---

<sup>1</sup> Retirado do *The American Heritage Dictionary, 2<sup>nd</sup> College Edition, 1994.*

diferentes? Tal questão tem um grande impacto agrônômico, e a sua resposta tem sido o principal foco das pesquisas atuais (Winicov, 1998).

A restrição induzida por um estresse não é necessariamente constante no curso do ciclo vital do indivíduo, mesmo que a intensidade de tal estresse não apresente variação. As plantas apresentam mecanismos metabólicos e fisiológicos que permitem não somente reagir à restrição, mas agir sobre a própria, como no caso de estresses químicos e bióticos (Lutts, 1996). A natureza dessa interação depende de parâmetros internos, próprios à planta, como por exemplo, o seu estágio de desenvolvimento, e de parâmetros externos como a cinética de imposição do estresse em conjunto com o ambiente no qual o indivíduo evoluiu (Lutts, 1996; Yeo, 1998; Hasegawa *et al.*, 2000).

Levitt (1980) definiu as restrições biológicas em dois grupos: as restrições biológicas elásticas e as plásticas. As restrições biológicas elásticas são aquelas onde as mudanças em uma determinada função em um organismo retornam para um nível ótimo quando as condições voltam ao nível ideal para a planta, como, por exemplo, uma fotossíntese reduzida em resposta a baixos níveis de luz. Se as mudanças causadas pelo estresse não retornam ao normal, mesmo com a ausência do fator estressante, o organismo está exibindo uma restrição biológica plástica<sup>2</sup>. Estresses de frio, alta temperatura, seca e altas concentrações de sal são citados pelos fisiologistas como estresses que provocam restrições plásticas (Salisbury & Ross, 1992).

Nem todos os fisiologistas do estresse em plantas aceitam as definições propostas por Levitt. Isso de certa forma se caracteriza em um problema, pois muitas vezes o termo estresse tem sido utilizado no sentido de restrição. Então é muito importante enfatizar as diferenças entre a causa (o estresse em si) e o efeito (a restrição).

### **1.1.2. A Resistência e a Tolerância ao Estresse**

O conceito de estresse é intimamente associado com o conceito de resistência ao estresse, que é a aptidão das plantas para um ambiente desfavorável (Taiz & Zieger, 2004). O'Toole & Chang (1979) distinguiram por resistência, em um *strictu sensu*, como a capacidade das células e dos tecidos de evitar a restrição, e a fuga, que é a capacidade das plantas de realizar a totalidade de seu ciclo reprodutivo enquanto o estresse não está presente. Segundo Lutts (1996), a resistência da planta apresenta de um ponto de vista conceitual, duas componentes: (i) as propriedades internas podem se opor à aparição de

---

<sup>2</sup> O termo restrição plástica não deve ser confundido com o termo "plasticidade fenotípica", que é usado para descrever a capacidade de resposta ou a flexibilidade de um caráter ao ambiente (Rhodes, 1987).

uma restrição produzida por um estresse específico; e (ii) os sistemas de adaptação das plantas podem permitir à planta de superar a restrição, uma vez que ela está estabelecida. Então, fala-se em resistência quando se tem o primeiro caso e fala-se em tolerância quando se tem o segundo caso.

A tolerância ao estresse, dentro de um sentido evolucionário, é a capacidade da planta de conviver com o agente estressor de uma maneira harmônica, e ter o seu crescimento e desenvolvimento melhorado caso o estresse esteja presente, representando assim um evento de co-evolução. Um exemplo adequado seria o grupo das plantas halófitas, que vivem em ambientes com altos teores de sais dissolvidos no solo. Alguns autores sugerem que o termo tolerância deve ser cuidadosamente utilizado, pois freqüentemente é confundido com resistência. Este último, como especificado acima, está mais relacionado à *aclimação* da planta a certo estresse. Yeo (1998) afirmou que os únicos organismos que podem ser considerados como tolerantes a salinidade no nível molecular são as halobactérias.

Outra diferença conceitual que deve ser destacada é a existente entre adaptação e aclimação. Se a resistência de uma planta a um determinado estresse aumenta como um resultado à exposição de um estresse anterior, diz-se que a planta está aclimatada ("endurecida", "preparada") (Taiz & Zieger, 2004). Respostas aclimatativas são transientes, envolvendo modificações induzidas pelo agente estressor ou pela restrição causada por ele, como por exemplo, alterações fisiológicas ou metabólicas no momento do estresse, sem controle genético (Pimentel, 2004). Segundo Jones & Jones (1989), o termo adaptação é freqüentemente utilizado com dois sentidos na literatura: o primeiro diz respeito à contribuição de um caráter ao ajustamento (*fitness*) de um organismo para sobrevivência em seu presente ambiente e o segundo diz respeito à origem evolucionária de tal característica. Neste caso, um mecanismo adaptativo é selecionado e passado de geração a geração. Os resultados dos processos de adaptação (o que é herdado) e de aclimação são adaptativos (no primeiro sentido).

### **1.1.3. A resposta das plantas aos estresses abióticos**

Estresses ambientais tais como baixas temperaturas, excesso de luz, seca e salinidade limitam, no mundo todo, a produtividade das culturas (Bray *et al.*, 2000; Xiong & Zhu, 2002; Chinnusamy *et al.*, 2004; Mahajan & Tuteja, 2005; Mittler, 2006). Tais condições influenciam negativamente a sobrevivência, a produção e acumulação de biomassa e a produção de grãos da maioria das culturas economicamente importantes (Grover *et al.*, 2001). Os diferentes ecossistemas mundiais são afetados por diversos fatores de estresse abióticos

específicos, e em variadas amplitudes. A sobrevivência das plantas em tais condições veio a partir da evolução de mecanismos intrínsecos de percepção dos sinais externos ambientais e de suas respectivas respostas metabólicas (Fujita *et al.*, 2006). Além disso, o grau de susceptibilidade das diferentes espécies de plantas é geralmente variado, variação que também está associada a estágios específicos do desenvolvimento (FIGURA 1) (Bohnert *et al.*, 1995; Bray *et al.*, 2000).

Na exposição a estresses ambientais, as plantas exibem uma grande variedade de respostas moleculares, celulares, atingindo praticamente todo aspecto da fisiologia e do metabolismo da planta (Flowers *et al.*, 2000; Hasegawa *et al.*, 2000; Xiong & Zhu, 2002; Zhu, 2002). Mudanças morfológicas e no desenvolvimento (como ciclo de vida, inibição do crescimento da parte aérea e aumento do crescimento da raiz), ajustamento no transporte de íons (como a absorção, extrusão e seqüestro de íons) e mudanças metabólicas (como metabolismo do carbono, síntese de solutos compatíveis) são respostas comuns a estresses ambientais variados (Xiong & Zhu, 2002). Algumas dessas respostas são desencadeadas por sinais de estresse ambiental primário, enquanto que outras podem resultar de estresses secundários ou de sinais causados pelos sinais primários. Apesar de algumas mudanças serem claramente aclimatativas, outras podem ser simplesmente conseqüências do dano causado pelo estresse (Rhodes, 1987; Xiong *et al.*, 2002b; Zhu, 2002).

Tais respostas podem ser consideradas como desvios da norma metabólica, onde a norma é um estado metabólico expresso sob a condição não estressante. No entanto, a condição posterior de *per se* pode ser altamente enganosa (Epstein *et al.*, 1980 *apud* Rhodes, 1987), principalmente no campo, onde as plantas freqüentemente estão expostas a uma combinação de vários estresses. Neste caso, as respostas metabólicas tendem a ser únicas e não podem ser simplesmente extrapoladas a partir daquelas encontradas em cada estresse aplicado isoladamente (Mittler, 2006). Além disso, as espécies de plantas diferem bastante em seus ambientes ótimos e nas suas suscetibilidades a estresses particulares (Jones & Jones, 1989). Níveis mais altos de temperaturas podem desencadear alterações metabólicas em plantas de clima temperado, embora sejam necessários para uma condição não-estressante em plantas de climas tropicais e semi-áridos.

Prever o impacto de um determinado estresse na planta é uma tarefa difícil e envolve o conhecimento, no mínimo parcial, de sua variação temporal, do potencial da planta para se aclimatar a tal estresse e da interação entre diferentes estresses e as respostas das plantas (Jones & Jones, 1989). Esta interação pode se dar tanto em sua ocorrência como em seus efeitos. Por outro lado, alguns tipos de estresses abióticos podem ser bem diferentes em sua natureza, no entanto, podem agir, pelo menos parcialmente, por meio de um mecanismo



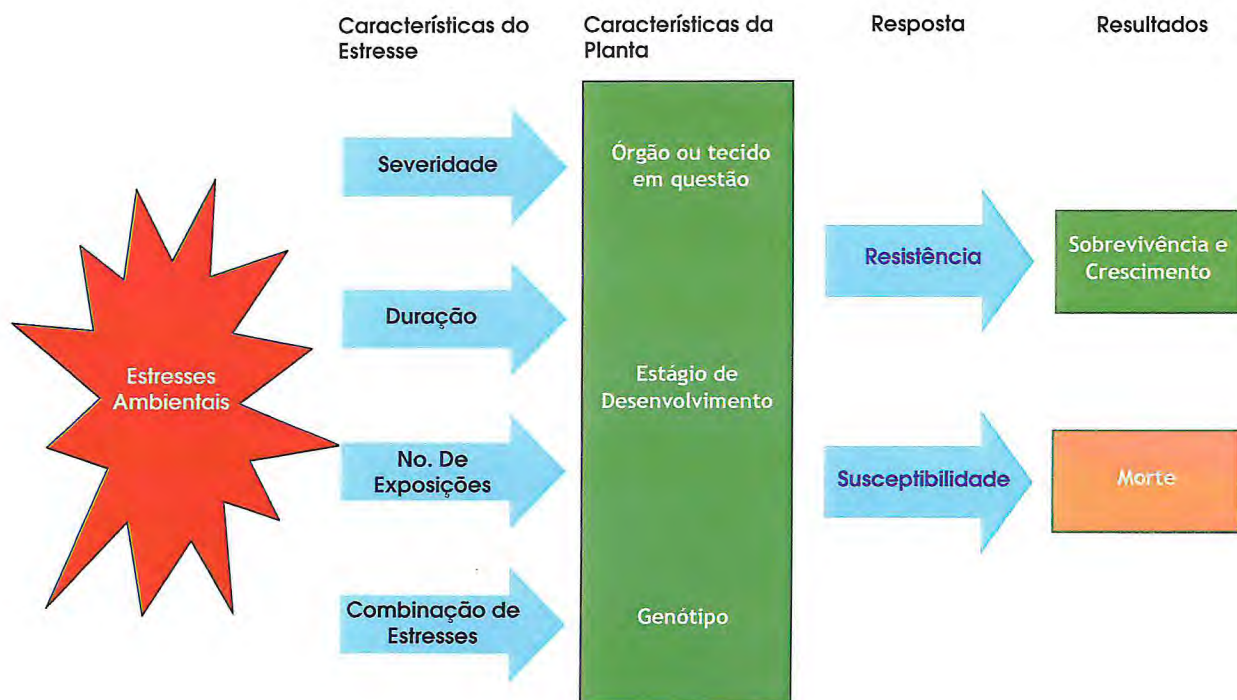


FIGURA 1 - Fatores que afetam a resposta das plantas aos estresses ambientais. Adaptado de Bray *et al.* (2000).

comum (Xiong *et al.*, 2002b; Zhu, 2002; Fujita *et al.*, 2006). O melhoramento eficaz da performance das mais diversas culturas depende do entendimento destas interações e convergências, bem como de suas conseqüências para as plantas e os ecossistemas (Jones & Jones, 1989; Bohnert *et al.*, 1995; Mittler, 2006).

## **1.2. O Estresse Hídrico**

### **1.2.1. A Definição de Seca**

A convenção das Nações Unidas para o Combate à Desertificação (UNCCD) define "Seca" como um fenômeno que ocorre naturalmente, que se instala quando a precipitação está bem abaixo dos níveis mais comumente registrados, causando sérios desequilíbrios hidrológicos que adversamente afetam os sistemas de produção de uma região (*Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO*, 2002). Segundo Swindale & Bidinger (1981), o termo "Seca" se refere a um determinado período de tempo sem chuva significativa. Esta definição destaca o fato de que a seca é um termo meteorológico que envolve um déficit na pluviometria (Jones *et al.*, 1981).

Em um sentido agrônômico e biológico, uma definição mais apropriada seria que a seca é uma circunstância, na qual as plantas sofrem redução de seu crescimento ou produtividade, devido à insuficiência de suprimento de água, ou a um grande déficit de umidade no ar, mesmo com um suprimento de água adequado do solo (Passioura, 1997). A ocorrência do déficit no solo dependerá da taxa de evaporação durante o período de ausência de chuvas e de características químicas do solo. Já o déficit hídrico nas plantas depende do grau de aridez da atmosfera e de diversas características que influenciam a absorção de água pelas plantas, a taxa de transpiração e a resposta da planta a este estresse hídrico (Levitt, 1980; Jones *et al.*, 1981; Pimentel, 2004).

### **1.2.2. Áreas Afetadas pela Seca no Mundo e no Brasil**

O estresse de seca nas plantas é uma das principais limitações ambientais que afeta a produção das culturas no mundo todo (Swindale & Bidinger, 1981; Bruce *et al.*, 2002; Chaves *et al.*, 2003; Chaves & Oliveira 2004; Reddy *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2004), sendo o fator que rege a distribuição das espécies nas diferentes zonas climáticas do globo (Pimentel, 2004). Nas regiões áridas e semi-áridas a disponibilidade de água é o principal fator limitante que define o crescimento das plantas e a produção das culturas nestas áreas,

normalmente carentes de grande produção de alimentos (Mengel & Kirkby, 2001), que não é suficiente para a sua crescente população (Rockström & Falkenmark, 2000). Além disso, a alta demanda evapo-transpiratória e a baixa capacidade de retenção de água no solo fazem com que as zonas semi-áridas tropicais sejam mais susceptíveis à seca do que as zonas semi-áridas de clima temperado (Swindale & Bidinger, 1981; Pimentel, 2004).

As regiões hiper-áridas (nestas incluídos os desertos climáticos), áridas e semi-áridas representam um pouco mais de um terço da superfície do globo terrestre (Le Houérou, 1996) (FIGURA 2). Segundo a FAO (2003) muitas das mais de 800 milhões de pessoas famintas no mundo moram nestas regiões, que se caracterizam por baixos índices de produção primária devidos principalmente à maior incidência de secas e degradação dos solos pelo uso de técnicas agrícolas rudimentares (Le Houérou, 1996; Fischer *et al.*, 2002). Ab'Sáber (1999), em seu "*Sertões e sertanejos: uma geografia humana sofrida*", afirmou que existem três grandes áreas semi-áridas na América do Sul: a região Guajira na Venezuela e Colômbia; a diagonal seca do Cone Sul, que envolve Argentina, Chile e Equador; e o Nordeste brasileiro, província fitogeográfica das caatingas. Esta região constitui cerca de 5% do território nacional (TABELA 1), onde vivem cerca de 23 milhões de pessoas, constituindo-se assim na região semi-árida mais povoada entre todas as terras secas.

O clima semi-árido do Nordeste caracteriza-se por fortes irregularidades nas chuvas de verão, ansiosamente esperadas pela maioria da população destas áreas, que vive da pequena agricultura ou agricultura de subsistência, sem acesso a novas tecnologias de plantio e de manejo. O volume total das precipitações é extremamente irregular, atingindo médias de 400 a 600 mm sob uma temperatura de 27 a 28 °C e média anual de incidência solar de 2800 horas (DNOCS, 1982). As altas temperaturas e alta insolação descompensam o nível e o volume das precipitações estacionais até fazer secar os cursos d'água à chegada da estação sem chuvas. A alta evaporação alcança médias de 2000 mm por ano (DNOCS, 1982) e contribui para o esvaziamento dos reservatórios superficiais e dos lençóis d'água de forma rápida e progressiva (Ab'Sáber, 1999). É o conjunto de tais características que demarcam a área comumente chamada de o "Polígono das Secas", que envolve 9 estados, do Piauí a Bahia, acrescida do Norte de Minas Gerais (DNOCS, 1982).

No decorrer da história, da época do império até os tempos atuais, inúmeras grandes secas assolaram o semi-árido nordestino, com repercussões antropológicas, econômicas e sociais, refletindo na própria cultura do povo dessa região<sup>3</sup>. Quando a irregularidade e precariedade no índice de precipitação se acentuam acima do normal há um comprometimento das culturas agrícolas e sobrevivência dos rebanhos. A desorganização

---

<sup>3</sup> Detalhes e descrição histórica das Secas no Nordeste estão disponíveis em: Guerra, P.B. A Civilização da Seca. Fortaleza, DNOCS, 1981. 324p.

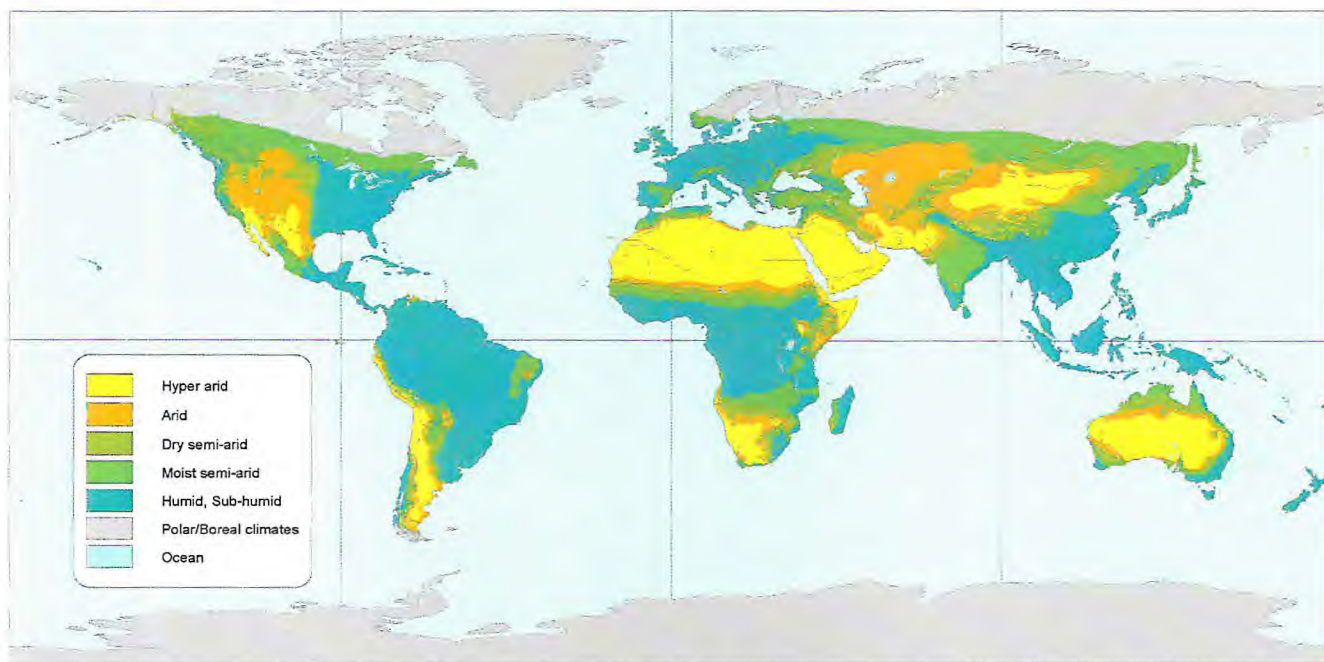


FIGURA 2 – Regiões Climáticas do Globo Terrestre. Fonte: Global Agro-ecological Zones (FAO – IIASA, 2000).

TABELA 1 – Tamanho das Áreas Secas no Mundo, na América do Sul e no Território Brasileiro ( $10^3 \text{ km}^2$ ) (Valores Retirados de Le Houérou, 1996)

Zonas Bioclimáticas	Mundo		América do Sul		Brasil	
	Área ( $10^3 \text{ km}^2$ )	%	Área ( $10^3 \text{ km}^2$ )	%	Área ( $10^3 \text{ km}^2$ )	%
Semi-áridas	23053	17,7	2645	14,96	330	3,88
Áridas	15692	12,1	445	2,52	120	1,41
Hiper-áridas	9781	7,5	257	1,45	0	0
<b>Total</b>	<b>130127</b>	<b>37,3</b>	<b>17675</b>	<b>18,93</b>	<b>8512</b>	<b>5,29</b>

estrutural desse setor da economia, o principal da região, provoca uma grande migração para os centros urbanos, principalmente os das Regiões Sudeste e Centro-Oeste (Ab'Sáber, 1999). Portanto, o problema das secas não se restringe apenas ao suprimento de água e ausência de precipitação. Consiste em um sério problema econômico e social, o qual necessita de um maior número de pesquisas que tenham como objetivo o melhoramento da prática da agricultura nesta região.

### 1.2.3. Resistência das Plantas à Seca

Em condições de estresse hídrico ou sob uma excessiva demanda evapotranspiratória, a sobrevivência da planta dependerá do conjunto de suas respostas metabólicas e fisiológicas (Pimentel, 2004). Tais respostas são complexas, e envolvem tanto mudanças aclimatativas e adaptativas, como efeitos danosos (Yordanov *et al.*, 2000; Mengel & Kirkby, 2001; Chaves *et al.*, 2002), daí a existência de inúmeras dúvidas sobre as suas vantagens e desvantagens para a planta (Passioura, 1997). Por ser um estresse multidimensional (Yordanov *et al.*, 2000), os efeitos da seca são bastante variáveis em função da sua intensidade (duração da deficiência hídrica), da velocidade de imposição do estresse e do estágio de desenvolvimento da planta no qual ela ocorre (Kramer & Boyer, 1995 *apud* Pimentel, 2004). Além destes fatores, a espécie da planta e o genótipo também são determinantes no estudo da resposta ao estresse hídrico (Bray, 1997; Bray *et al.*, 2000).

Segundo Jones *et al.* (1981), a resistência à seca é um termo genérico utilizado para descrever uma variedade de mecanismos pelos quais as plantas suportam períodos de clima seco. Turner (1986) propõe três tipos de resistência das plantas à deficiência hídrica: Mecanismos de Escape (do inglês *escape*); Mecanismos de Tolerância sob alto conteúdo de água; e Mecanismos de Tolerância sob baixo conteúdo de água<sup>4</sup>. Os mecanismos de escape se referem à habilidade da planta de completar o ciclo antes de ocorrer uma falta de água severa. Este tipo de resistência se caracteriza por um rápido desenvolvimento fenológico, geralmente durante o curto período de chuvas, bem como uma plasticidade neste desenvolvimento, que permite a planta encurtar ou prolongar o seu ciclo de vida quando ocorre a falta de água (Chaves *et al.*, 2003; Pimentel, 2004; Taiz & Zieger, 2004).

Já os Mecanismos de Tolerância sob alto conteúdo de água, segundo Jones *et al.* (1981), referem-se à habilidade da planta de manter uma alta hidratação ( $\Psi_w$  no tecido) durante um período de alta demanda evaporativa ou de déficit hídrico no solo. Isso pode ser alcançado a partir de uma restrição na perda de água nos tecidos ou da manutenção da

---

<sup>4</sup> Na literatura são encontradas variações desta classificação. O termo *Tolerância* é utilizado pelo autor na descrição original destes mecanismos e, portanto, foi mantido no presente texto, mesmo estando em contradição com as definições utilizadas na Seção 1.2.

absorção de água por parte da planta. Na redução da perda de água, três principais mecanismos podem ser listados: a redução na condutância da epiderme, através de processos como fechamento estomático (Taiz & Zieger, 2004), espessamento da cutícula (Riederer & Schreiber, 2001); redução na radiação absorvida, através de movimentos foliares e mudanças nas características refletoras das folhas, como enrolamento, mudanças nos ângulos, aumento da produção de tricomas, ceras e cristalização de sal na superfície foliar (Turner, 1986); e por redução na superfície evaporativa, através da senescência e morte das folhas mais velhas e aumento do índice de caducifolia (Jones *et al.*, 1981; Rao, 2001). Na manutenção da absorção de água, 2 mecanismos têm elevada importância: o crescimento das raízes, tanto em profundidade como em densidade (Chaves *et al.*, 2002; Mahajan & Tuteja, 2005); e o aumento da condutância hidráulica dos tecidos (Jones *et al.*, 1981), provavelmente por uma maior expressão de aquaporinas (Ramanjulu & Bartels, 2002; Tyerman *et al.*, 2002).

Os Mecanismos de Tolerância sob baixo conteúdo de água referem-se à habilidade da planta de submeter-se à baixa hidratação, ou seja, funcionar com seus tecidos parcialmente desidratados (Taiz & Zieger, 2004). Para isso a planta deve manter a sua pressão de turgescência. Esta manutenção, à medida que o potencial hídrico da planta decresce, é crucial para a expansão celular, para o crescimento e para muitos dos processos bioquímicos e fisiológicos, e é um importante mecanismo de resistência à seca (Jones *et al.*, 1981; Chaves *et al.*, 2003). Dois processos podem contribuir para a manutenção da pressão de turgescência: um baixo potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) devido a uma alta concentração de solutos natural ou por acumulação, em um processo chamado de ajustamento osmótico (AO) (Mahajan & Tuteja, 2005); e por uma alta elasticidade de tecido.

O ajustamento osmótico pode ser alcançado por um aumento na concentração de uma variedade de solutos, incluindo açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e íons inorgânicos como o  $K^+$  (Hare *et al.*, 1998; Mahajan & Tuteja, 2005). No entanto, pelo fato de que o metabolismo da célula pode ser severamente inibido por altas concentrações de íons, esta acumulação parece ser restrita aos vacúolos. Por causa desta compartimentação, outros solutos devem ser acumulados no citoplasma para manter um equilíbrio de potencial hídrico dentro da célula (Taiz & Zieger, 2004). Estes outros solutos são normalmente chamados de solutos compatíveis e não interferem no metabolismo vegetal (Viégas & Silveira 1999; Silveira *et al.*, 2001; 2003). Entre estes solutos estão o aminoácido prolina, álcoois como sorbitol e manitol e aminas quaternárias como a glicinabetaína (Hare *et al.*, 1998). Apesar de ser amplamente aceito que a acumulação destes solutos é determinante no ajustamento osmótico, sua importância tem sido intensamente discutida e há necessidade de mais evidências (Serraj & Sinclair, 2002).

#### **1.2.4. Respostas Fisiológicas das Plantas ao estresse hídrico**

Segundo Yordanov *et al.* (2000), a resposta à seca na planta como um todo e na cultura é complexa, pois reflete a integração entre os efeitos e as respostas ao estresse sob todos os níveis de organização da planta, integrados no tempo e no espaço. Essa complexidade constitui-se o principal obstáculo a um entendimento completo dos danos causados pelo estresse hídrico ou dos mecanismos de resistência das plantas (Ingram & Bartels, 1996). Devido ao fato de que a resistência ao estresse é um caráter essencialmente multigênico (Agarwal *et al.*, 2006; Bohnert *et al.*, 2006), as vias bioquímicas que resultam em produtos ou processos que melhoram a resistência agem provavelmente de forma aditiva ou sinérgica (Bohnert *et al.*, 1995; Vinocur & Altman, 2005), dificultando ainda mais a sua compreensão (Vashisht & Tuteja, 2006). Mesmo com o crescente número de estudos, nos últimos 20 anos, há ainda muitas lacunas no conhecimento dessas respostas, nos mais variados níveis.

Um dos principais efeitos fisiológicos da seca nas plantas é a redução no crescimento vegetativo (Mahajan & Tuteja, 2005), tanto nas raízes como na parte aérea e ocorre mesmo quando pequenas mudanças no *status* hídrico da planta estão envolvidas (Mengel & Kirkby, 2001). O crescimento compreende tanto a expansão, como a divisão celular. O primeiro, como é um processo dependente da turgescência, é extremamente sensível ao estresse hídrico (Chaves *et al.*, 2003). O segundo processo é influenciado por uma atividade reduzida de proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDKs), que resultará em uma menor divisão celular sob condições de déficit de água (Schuppler *et al.*, 1998; Zhu, 2002). O crescimento da folha é geralmente mais sensível do que o das raízes, sendo até benéfico nestas condições devido a uma diminuição da transpiração. O crescimento relativo das raízes pode sofrer um acréscimo para aumentar a capacidade do sistema radicular de absorver mais água (Mahajan & Tuteja, 2005).

Juntamente com a inibição de crescimento das folhas, o fechamento estomático está entre as primeiras respostas à seca, protegendo as plantas da perda de água através da transpiração (Chaves *et al.*, 2003). O fechamento estomático pode resultar de 2 tipos de processos: o fechamento hidropassivo, devido a uma evaporação direta da água das células-guarda, sem envolvimento metabólico; e o fechamento hidroativo, que necessita mudanças nos fluxos de íons e metabólitos, e é dependente do metabolismo (Mahajan & Tuteja, 2005). Este último é provavelmente regulado pelo hormônio Ácido Abscísico (ABA). Este hormônio afeta a abertura estomática controlando o influxo e efluxo de  $K^+$  nas células-guarda, assim como os de  $Cl^-$  e de ácidos orgânicos na plasmalema e tonoplasto destas células. Este

processo controlará a entrada ou saída de água das células-guarda e o conseqüente movimento estomático (Taiz & Zieger, 2004).

O crescimento da planta e sua resposta a uma condição de estresse estão em grande medida sob o controle de hormônios. Estes, em particular o ABA, as citocininas e o etileno, estão entre os agentes químicos que estão envolvidos na sinalização entre raízes e parte aérea (Sharp, 2002; Chaves *et al.*, 2003). A natureza destes sinais das raízes, como eles são induzidos e como eles agem são alvo de vigorosos debates (Passioura, 2002). Sob condições de estresse hídrico, alta demanda evaporativa, alta luminosidade e alta temperatura foliar, há um aumento do pH da seiva do xilema, promovendo o carregamento de ABA para o xilema das raízes e o seu transporte para a parte aérea. Este transporte provoca uma redução na condutância estomática e uma modificação no crescimento e na fisiologia das folhas (Netting, 2000). No entanto, muitas das modificações neste fluxo de ABA ocorrem também por mudanças nas relações de pH de diferentes compartimentos da folha (Sauter *et al.*, 2001; Wilkinson & Davies, 2002). Enquanto isso, a expansão celular da raiz pode ser mantida, pois o ABA acumulado na raiz impede a produção de etileno (Sharp, 2002).

O fechamento estomático em resposta ao estresse hídrico resulta primariamente em um declínio na taxa de fotossíntese (Pimentel, 2004; Mahajan & Tuteja, 2005). Embora a resposta estomática seja provavelmente o fator mais importante no controle da fixação do carbono, o decréscimo na fotossíntese em condições de déficit hídrico tem sido atribuído tanto a limitações estomáticas, como não-estomáticas (Yordanov *et al.*, 2000; Flexas & Medrano, 2002). Alguns estudos mostram que a limitação da atividade fotossintética é mais um efeito metabólico, pois a concentração interna de CO<sub>2</sub> na folha ( $C_i$ ) se mantém alta ou mesmo aumenta com a seca (Pimentel, 2004; Taiz & Zieger, 2004). No entanto, Lawlor & Cornic (2002), Chaves *et al.* (2002; 2003), Chaves & Oliveira (2004) e Souza *et al.* (2004) afirmam que a limitação da fotossíntese é devida principalmente à menor difusão de CO<sub>2</sub> para o interior da folha (menor  $C_i$ ) e conseqüente menor disponibilidade deste para a enzima RuBisCO. Ainda segundo tais autores a limitação metabólica só ocorreria em condições de estresse severo.

O dessecação dos tecidos induz uma redução no transporte de elétrons, na fotofosforilação e na síntese de ATP, conseqüentemente diminuindo a capacidade de regeneração da Ribulose-1,5-Bifosfato (RuBP) (Pimentel, 2004). Cornic (2000), Lawlor (2002) e Lawlor & Cornic (2002) confirmam essa redução na síntese de ATP, mesmo em estresses moderados, no entanto, sugerem não ser esse um fator limitante à fixação do CO<sub>2</sub>. Há relatos também de que, sob estresses abióticos, há uma diminuição da quantidade e atividade da RuBisCO (Parry *et al.*, 2002), um motivo a mais para uma redução na fixação (Yordanov *et al.*, 2000; Bota *et al.*, 2004). O estresse hídrico, quando associado a uma alta



radiação luminosa causa a degradação de proteínas importantes ao Fotossistema II (PSII), no entanto, em condições medianas de estresse, o PSII é preservado (Yordanov *et al.*, 2000). Ghannoum *et al.* (2003), sugerem que a menor sensibilidade da atividade do PSII pode ser devida ao desvio de elétrons da cadeia de transporte para as reações de Mehler, cuja atividade é aumentada sob déficit hídrico (Chaves *et al.*, 2002) e pela maior atividade fotorrespiratória sob seca (Noctor *et al.*, 2002), que consome ATP e NADPH<sub>2</sub>.

Com a redução da assimilação de CO<sub>2</sub>, o amido de reserva começa a ser hidrolisado para suprir a respiração celular (Kramer & Boyer, 1995), havendo assim um maior acúmulo de carboidratos solúveis e ácidos orgânicos (Pimentel, 2004). Mesmo em condições de estresse hídrico leve já se observa uma diminuição na síntese protéica, e sob condições de estresse moderado há um início do processo de proteólise. A partir daí há um aumento no conteúdo de aminoácidos livres nos tecidos e redução no conteúdo protéico (Viégas & Silveira, 1999; Silveira *et al.*, 2001; 2003; Pimentel, 2004). Mesmo com uma diminuição na síntese protéica, ela ocorre em algumas proteínas envolvidas na interação hidrofílica com macromoléculas celulares, para a sua estabilização, como as deidrinas (Yordanov *et al.*, 2000), proteínas abundantes na embriogênese tardia (*Late Embryogenesis Abundant Proteins* – LEAs) e proteínas do choque térmico (*Heat Shock Proteins* - HSPs) (Hoekstra *et al.*, 2004) e também atuam na recuperação dos danos causados pelos estresses térmico, osmótico e de desidratação (Xiong *et al.*, 2002a).

O estresse hídrico também altera o metabolismo dos lipídeos, a associação entre lipídeos e proteínas de membrana, e a composição protéica e lipídica das membranas (Yordanov *et al.*, 2000; Xiong *et al.*, 2002b). Com o déficit hídrico mais severo, há alteração na composição dos lipídeos de membrana, com redução no conteúdo de lipídeos polares e poli-insaturados (Pimentel, 2004), primeiro dos glicolipídeos e, com a severidade do estresse dos galactolipídeos (Monteiro de Paula *et al.*, 1993 *apud* Pimentel, 2004). Ainda segundo este autor, esse decréscimo no conteúdo lipídico nas membranas de plantas estressadas é devido à redução do processo de biossíntese de lipídeos e aumento dos processos de degradação pela maior atividade de lipases. Esta prevalência dos processos de degradação em relação aos de síntese também foi relatada em *Arabidopsis* (Gigon *et al.*, 2004). Estes autores sugerem que há relações entre a capacidade da planta de manter ou até mesmo aumentar seu conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados e a sua resistência ao estresse.

Nos últimos anos, na tentativa de se entender as respostas das plantas a estresses ambientais, entre eles o hídrico, muitos genes foram identificados e caracterizados (Bray *et al.*, 1997; Vinocur & Altman, 2005; Agarwal *et al.*, 2006). Estes efeitos dos estresses abióticos na expressão gênica e no metabolismo oxidativo, relacionados às espécies ativas de oxigênio (AOS) serão comentados mais adiante neste texto.

## 1.3. O Estresse Salino

### 1.3.1. O crescente problema da Salinidade

Segundo levantamento da FAO (2005), cerca de 800 milhões de hectares de terra em todo o mundo são afetados por sal, tanto pela salinidade (397 milhões de ha) (Figura 3) como pela condição associada de sodicidade (434 milhões de ha) (Figura 4). Isto é mais de 6% do total de área terrestre do mundo. Os solos que contém uma grande concentração de  $\text{Na}^+$  são, por definição, chamados de solos sódicos. Os solos salinos são aqueles que possuem uma alta concentração de sais totais (TABELA 2). Em algumas áreas  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , assim como o  $\text{NaCl}$  podem contribuir substancialmente para a salinidade. A alta concentração de  $\text{Na}^+$  de um solo sódico, além de seus efeitos nas plantas, contribui também para a degradação da estrutura do solo, provocando um grande decréscimo na porosidade e permeabilidade de água (Taiz & Zieger, 2004; Rengasamy, 2006) (TABELA 2).

Cerca de 2% da agricultura de sequeiro e 20% da agricultura irrigada são afetadas pela salinidade (FAO, 2005). Grande parte desta salinidade e toda a sodicidade são de procedência natural. No entanto, uma porção significativa das terras destinadas à agricultura tem se tornado salina por causa do desmatamento e da irrigação (Yeo, 1999; Munns, 2005). O seu uso intensivo é uma das principais causas da crescente degradação das terras agriculturáveis. O sal dissolvido na água de irrigação é deixado no solo após a evapotranspiração (Flowers *et al.*, 2000; Munns, 2002; Taiz & Zieger, 2004). Entretanto, como vimos na seção anterior, aproximadamente 40% da superfície do globo terrestre são de desertos e terras secas. Tais áreas só se tornam mais produtivas através da utilização da irrigação. A qualidade da água de irrigação nas regiões áridas e semi-áridas é geralmente muito pobre. Essa forte ligação da irrigação com a salinização tem provocado uma discussão imediata sobre o seu uso para o aumento da produção agrícola (Flowers, 2004).

No Brasil, segundo estimativa da FAO (2005), cerca de 20 – 25% das áreas irrigadas próximas a rios e córregos periódicos, principalmente em solos aluviais, têm problemas de salinidade ou de drenagem. Além destas áreas, cerca de 2,4% da superfície total de nosso território possuem áreas naturalmente afetadas por sal. De acordo com uma prospecção de solo feita para os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Rio Grande do Norte e Sergipe, compreendendo 110 milhões de hectares, as áreas afetadas por sal foram estimadas em 9,1 milhões de hectares, cerca de 9% da área pesquisada, incluindo solos salinos e sódicos. Irrigação excessiva, ineficiente gerenciamento do solo e dos recursos hídricos, invasão de águas marinhas e drenagem insuficiente, com conseqüente aumento nos níveis dos lençóis freáticos e de áreas de alagamento, solos rasos e com baixa fertilidade e irrigação com

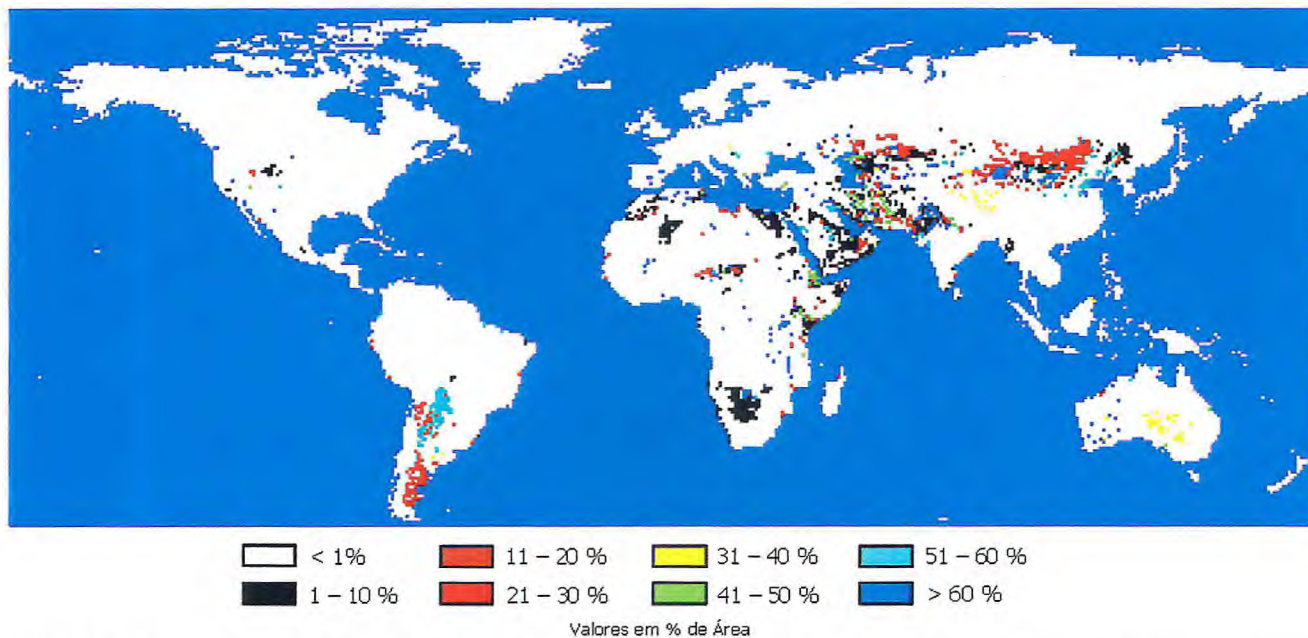


FIGURA 3 – Distribuição dos Solos Salinos no Mundo. As diferentes cores indicam valores aproximados de porcentagem do total de cada área atingida pela salinidade (em km<sup>2</sup>). Adaptado de FAO (2005).

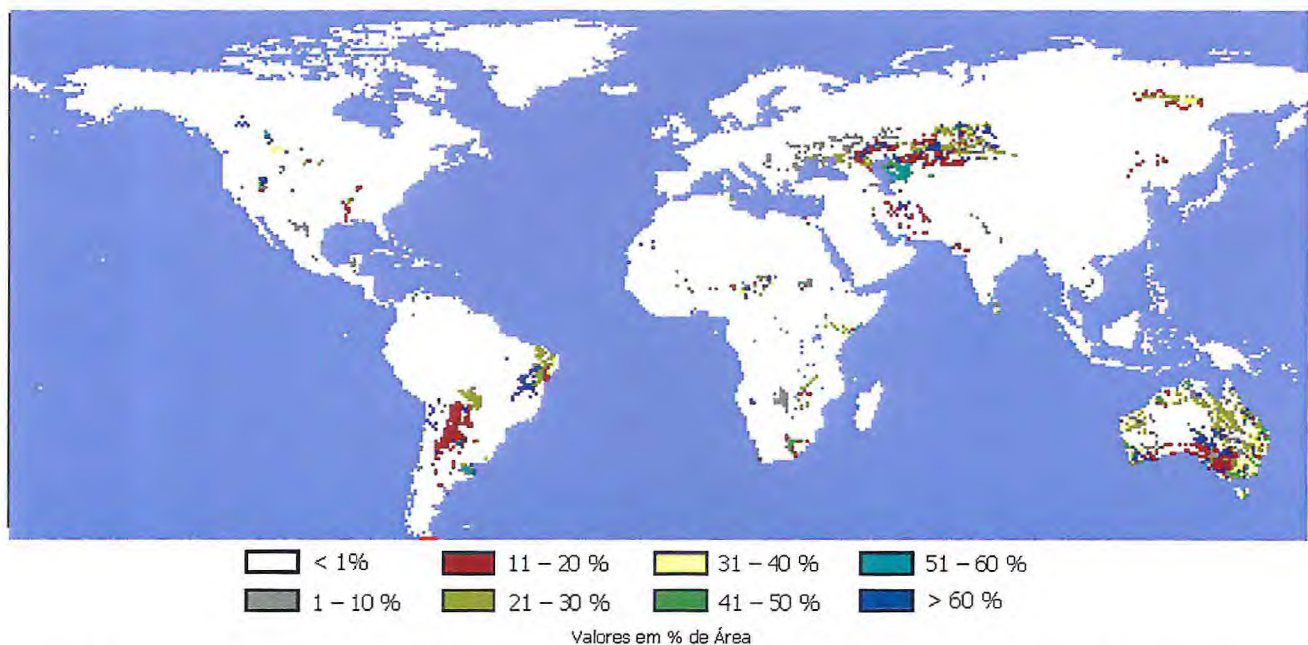


FIGURA 4 – Distribuição dos Solos Sódicos no Mundo. As diferentes cores indicam valores aproximados de porcentagem do total de cada área atingida pela condição de sodicidade (em km<sup>2</sup>). Adaptado de FAO (2005).

TABELA 2 – Definição dos solos salinos e sódicos, classificados de acordo com o Laboratório de Salinidade do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USSL – USDA). Adaptado de Munns (2005)

<b>Termo</b>	<b>Definição</b>	<b>Descrição</b>	<b>Efeito no Crescimento das Plantas</b>	<b>Comentários</b>
Salinidade	Solos Salinos têm uma alta concentração de sais solúveis. Eles são classificados como salinos quando a $CE_e \geq 4 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ .	Esta definição deriva da $CE_e$ que reduziria o crescimento da maioria das culturas. No entanto, muitas culturas são afetadas por uma $CE_e < 4 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ .	Componentes específicos, osmóticos e salinos, inibem o crescimento das raízes e parte aérea.	$CE_e$ é a condutividade elétrica do extrato saturado, e reflete a concentração dos sais em um solo saturado. Uma condutividade de $4 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ é equivalente a 40 mM de NaCl.
Sodicidade	Solos sódicos têm uma pequena concentração de sais solúveis, mas possuem uma alta porcentagem de troca de sódio (ESP). Eles são classificados como sódicos quando a $ESP \geq 15$ .	Esta definição deriva da ESP que causa degradação da estrutura dos solos argilosos, causados pela deslocação de cátions divalentes ligados a cargas negativas nas partículas de argila, pelo $\text{Na}^+$	A pobre estrutura de solo inibe o crescimento das raízes	Em alta ESP, as partículas da argila se separam. A drenagem do solo é pobre e ele se torna alagado quando molhado. Ele também se torna muito duro quando seco.
Alcalinidade	Solos alcalinos são um tipo de solos sódicos com um alto pH. Eles são definidos por possuir uma $ESP \geq 15$ com um pH 8,5 - 10,0.	O alto pH é causado pelos sais carbonatos.	Alto pH afeta a absorção de nutrientes.	

águas salinas sem gerenciamento adequado são as principais causas da salinidade nos solos do território brasileiro (FAO, 2005).

Comprometendo ainda mais este panorama, estão os estudos e a recente preocupação da comunidade científica acerca do aquecimento global. Le Houérou, em um estudo de 1996, afirmou que, devido à duplicação do conteúdo de CO<sub>2</sub> na nossa atmosfera, haverá um possível aumento de 1 a 3 °C na temperatura das regiões áridas e semi-áridas nos próximos 50 anos. Além disso, haverá também um significativo aumento na evapotranspiração e um decréscimo na precipitação média anual entre 4 a 5%. A partir deste aquecimento, estão sendo previstos riscos de grandes ciclos de seca intercalados por grandes enchentes, principalmente na região Intertropical (FAO, 2007). Isto ampliará ainda mais a necessidade da irrigação para sustentar a produção agrícola nestas áreas e provavelmente irá provocar um aumento das áreas afetadas por sal (Yeo, 1999; Flowers *et al.*, 2000; Flowers, 2004; Rengasamy, 2006). Por outro lado, o aumento na concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera induzirá um aumento da produção, principalmente nas espécies de metabolismo C<sub>3</sub> (em menor intensidade nas C<sub>4</sub>) e um aumento na eficiência do uso de água em ambas (Le Houérou, 1996; Fischer *et al.*, 2002).

Tal mudança climática resultará em novas combinações de solo, clima, constituintes atmosféricos e radiação solar, sem mencionar os fatores bióticos (Yeo, 1999). Sob estas novas condições, uma nova agricultura sustentável é mais do que necessária. Esta deverá ter como base não apenas princípios agronômicos, mas deve também englobar um entendimento das restrições e interações de outras dimensões da produção agrícola, incluindo a flexibilidade para diversificar e desenvolver uma base genética ampla para assegurar uma rápida possibilidade de resposta rápida a estas novas condições (Fischer *et al.*, 2002; Flowers, 2004). Apesar de inúmeras tentativas nos últimos 30 anos, pouco sucesso foi alcançado no aumento da resistência das plantas a condições de seca e salinidade, principalmente devido à dificuldade de tal tarefa (Flowers & Yeo, 1995; Flowers *et al.*, 2000). Estes são os dois principais estresses abióticos que influenciam na produção das culturas, e estão comumente associados, não apenas nas suas áreas de incidência, mas também porque os mecanismos de resposta das plantas a estes dois estresses estão intrinsecamente relacionados (Zhu, 2002; Mahajan & Tuteja, 2005).

### **1.3.2. Mecanismos Fisiológicos de resposta das plantas ao Estresse Salino**

A presença de sal no solo tem dois principais efeitos no crescimento da planta. Primeiro, a alta concentração na solução do solo reduz a habilidade da planta de absorver água e isto leva a um crescimento mais lento. Este é conhecido como o efeito osmótico ou

déficit hídrico causado pela salinidade. Segundo, o sal pode entrar na corrente transpiratória e eventualmente danificar as células foliares, reduzindo ainda mais o crescimento e provocando um grande distúrbio metabólico. Este é o efeito iônico ou específico da presença de sal (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2002; Munns, 2005; Munns *et al.*, 2006). Segundo Munns (2005), estes dois efeitos dão origem a uma resposta de 2-fases do crescimento das plantas face à salinidade, representada na FIGURA 5.

A fase 1 consiste mais nos efeitos do sal fora da planta, ainda na solução do solo. Nesta fase, os processos metabólicos e celulares envolvidos na resposta são comuns aos efeitos da seca nas plantas<sup>5</sup>, como redução na condutância estomática, inibição do crescimento da parte aérea, diminuição na taxa fotossintética, alterações na membrana celular (Zhu, 2002; Mahajan & Tuteja, 2005), além de uma aquisição de nutrientes atenuada (Hasegawa *et al.*, 2000; Júnior, 2002). Nesta os íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> não se acumularam nos tecidos em concentrações que efetivamente inibam o crescimento: os tecidos meristemáticos são alimentados pelo floema, do qual o sal é efetivamente excluído; e as células em alongamento rápido podem acomodar a pequena quantidade de sal que chega no xilema dentro dos vacúolos em expansão (Munns, 2005; Munns *et al.*, 2006). O motivo dominante para esta redução no crescimento durante a fase inicial dos estresses salino e hídrico é alvo de diversas discussões e controvérsias. Existem fortes evidências de que esta não estaria relacionada ao *status* hídrico, e sim a sinais químicos das raízes para a parte aérea, onde haveria um provável papel do hormônio ABA (Mahajan & Tuteja, 2005; Munns, 2005).

A fase 2 da resposta do crescimento resulta do efeito tóxico do sal dentro da planta. O sal acumulado pela planta se concentra nas folhas velhas e o seu transporte contínuo para as folhas em transpiração por longos períodos resultará em altas concentrações de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> que poderão provocar a morte das folhas (Munns, 2002). A causa do dano é provavelmente o carregamento de sal que excede a habilidade das células de compartimentá-lo nos vacúolos. Então, sua concentração no citossol irá aumentar, levando a uma inibição da atividade de diversas enzimas e um completo distúrbio no metabolismo celular (Zhu, 2001). Os íons podem também se acumular na parede celular, levando a uma diminuição do volume celular, com conseqüente aumento da concentração de íons dentro da célula, causando assim sua desidratação (Munns, 2002). Em algumas espécies de plantas, como *Citrus* e videiras, o Cl<sup>-</sup> é que se acumula na parte aérea causando danos, enquanto que o Na<sup>+</sup> é retido nas raízes (Storey & Walker, 1999; Tester & Davenport, 2003).

Os mecanismos para a resistência da planta para os efeitos específicos da salinidade são basicamente de dois tipos: Os que minimizam a entrada de sal para a planta; e os que diminuem a concentração de sal no citoplasma (Zhu, 2001; Munns, 2005). A aclimatação por

---

<sup>5</sup> Estes efeitos são semelhantes aos comentados na Seção 2.4.

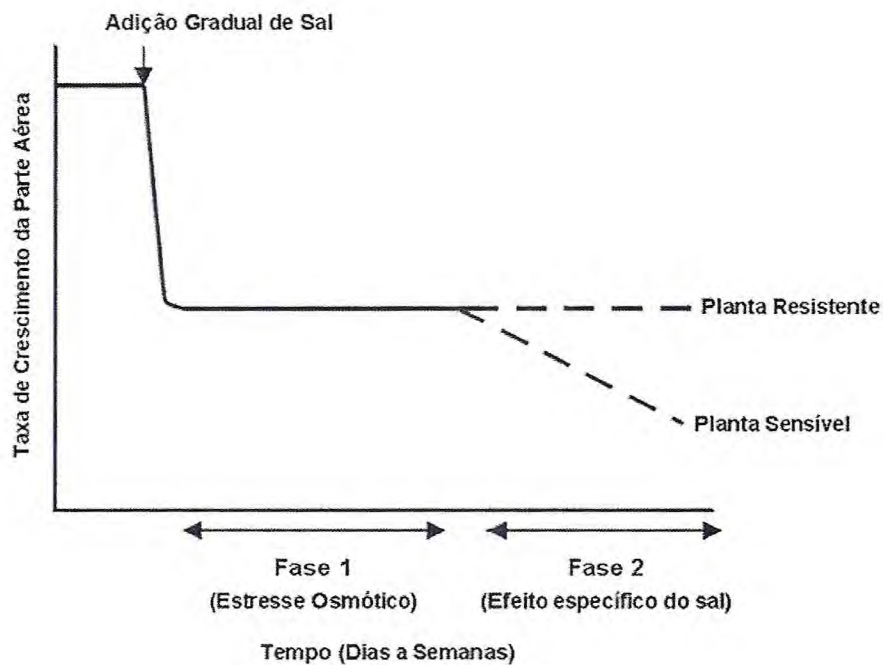


FIGURA 5 – Gráfico esquemático das 2 fases da resposta do crescimento das plantas sob o efeito da salinidade. O tempo (Dias a semanas), representando aqui uma espécie anual, depende da espécie de planta, do tipo de substrato e de parâmetros ambientais como luminosidade e temperatura. Adaptado de Munns (2005).

meio da exclusão do sal requer mecanismos para evitar um déficit hídrico interno (Júnior, 2002). A adaptação por meio da inclusão pode ocorrer através de uma alta tolerância ao  $\text{Na}^+$  e ao  $\text{Cl}^-$ , ou evitando-se altas concentrações salinas no tecido, o que pode ser adquirido pelo acúmulo do sal em regiões fora do citossol, como nos vacúolos ou, em algumas espécies de halófitas, em glândulas especializadas (Winicov, 1998; Hasegawa *et al.*, 2000; Tester & Davenport, 2003). Embora possa se fazer uma clara distinção entre "includoras" e "excludoras" de sais, existe, na realidade, um espectro contínuo de diferentes graus de inclusões e exclusões, entre  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , e entre diferentes partes e órgãos da planta (Júnior, 2002).

A entrada do  $\text{Na}^+$  para dentro da célula da planta é um processo essencialmente passivo. A diferença de potencial elétrico negativa na membrana plasmática (Potencial de Membrana) e a pequena concentração de  $\text{Na}^+$  no citossol favorece fortemente o movimento deste íon para dentro da célula. Embora ainda não bem entendido, há fortes evidências de que este influxo de  $\text{Na}^+$  é realizado através de vias que funcionam para aquisição de  $\text{K}^+$  (Serrano *et al.*, 1999; Blumwald *et al.*, 2000). Isto levará a uma diminuição na razão  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , interferindo na absorção de  $\text{K}^+$  pela célula vegetal. Este íon é um dos elementos essenciais e é necessário às plantas em grandes quantidades (Mahajan & Tuteja, 2005). Mais de 50 enzimas necessitam de  $\text{K}^+$  como cofator e altos valores da razão  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  podem levar a uma séria desorganização no metabolismo celular. Além disso, o  $\text{K}^+$  é necessário para a ligação do tRNA ao ribossomo, durante a síntese de proteínas, sendo, portanto, um dos processos mais afetados por altas concentrações de  $\text{Na}^+$  (Tester & Davenport, 2003).

Mesmo com este considerável fluxo a maioria das plantas mantém a concentração de  $\text{Na}^+$  em níveis não-tóxicos e uma alta razão  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  no citoplasma. Isto se deve a exclusão do sódio através da membrana plasmática ou sua compartimentação no vacúolo. Ambos são processos ativos, do tipo secundário (Taiz & Zieger, 2004). O mecanismo de exclusão do  $\text{Na}^+$  é realizado principalmente pelos transportadores, do tipo antiporte,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de membrana plasmática. Estes utilizam o gradiente eletroquímico gerado pela bomba  $\text{H}^+$ -ATPase da membrana celular, aproveitando a entrada passiva do  $\text{H}^+$  para o lado interno da membrana para excluir o íon  $\text{Na}^+$  contra o seu gradiente eletroquímico (Blumwald *et al.*, 2000). Já a compartimentação do  $\text{Na}^+$  proporciona um mecanismo eficiente para evitar os efeitos tóxicos de suas altas concentrações e ainda permite às plantas utilizar o NaCl como um agente osmótico, mantendo o potencial osmótico que dirige a entrada de água nas células. A passagem para o vacúolo é catalisada pelo transportador, do tipo antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  vacuolar. O gradiente eletroquímico de  $\text{H}^+$  é estabelecido pela bomba  $\text{H}^+$ -ATPase e pela  $\text{H}^+$ -PPiase (Blumwald *et al.*, 2000; Tester & Davenport, 2003).



À medida que a concentração de  $\text{Na}^+$  vai aumentando nos vacúolos devido ao processo de compartimentação, o potencial osmótico no citoplasma deve ser balanceado com o do vacúolo. Isto é realizado pela síntese e acumulação no citoplasma de solutos orgânicos que não interfiram nas reações bioquímicas. Estes são os chamados solutos compatíveis ou osmoprotetores, os mesmos que são acumulados e estão relacionados à resistência ao estresse hídrico, discutidos na seção 2.3. O consenso geral é de que, enquanto no estresse hídrico a sua função está mais relacionada ao ajustamento osmótico, mantendo a turgescência celular e evitando a desidratação das células, no estresse salino, onde a desidratação é menos provável, eles estão relacionados ao balanceamento da pressão osmótica no citoplasma, já que os íons estão acumulados no vacúolo (Munns, 2005). No entanto, a separação dos efeitos destes compostos na resistência à salinidade e na resistência à seca é extremamente difícil (Tester & Davenport, 2003).

#### **1.4. Sinalização Metabólica nos Estresses Hídrico e Salino**

As plantas, como organismos sésseis, desenvolveram ao longo do curso evolutivo mecanismos intrincados de percepção de sinais externos que permitem a sua resposta e sobrevivência às mais variadas condições ambientais (Fujita *et al.*, 2006). O processo pelo qual a planta percebe os diferentes sinais de estresse e os transmite para toda a maquinaria celular é chamado de transdução de sinais (Xiong & Zhu, 2001). Embora se reconheça a importância da sinalização dos estresses salino e hídrico, até poucos anos atrás poucos componentes moleculares eram conhecidos (Zhu, 2002). O entendimento destes mecanismos pelos quais as plantas ativam suas respostas de aclimação às novas condições que estão se impondo é de fundamental importância para a biologia e é vital para um desenvolvimento contínuo de um melhoramento racional para melhorar a resistência das culturas aos estresses abióticos (Xiong *et al.*, 2002b).

##### **1.4.1. Percepção e Transdução de Sinais Ambientais**

As respostas celulares são iniciadas primariamente pela interação do material extracelular com uma proteína da membrana plasmática. A molécula extracelular é chamada de ligante (ou elicitor) e a proteína da membrana, que se liga e interage com esta molécula é chamada de receptor (Mahajan & Tuteja, 2005). De uma forma geral, o processo de sinalização acontece da seguinte maneira: o sinal de um determinado estresse é percebido pelo receptor na membrana e é então transduzido para dentro da célula. Isto resultará na

geração de *Segundo Mensageiros*, como espécies ativas de oxigênio (AOS), inositol fosfatos que atuarão na modulação do nível de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Shao *et al.*, 2007). O distúrbio neste nível é percebido por proteínas de ligação a cálcio, conhecidas como sensores de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas iniciarão uma cascata de fosforilação que tem como alvo proteínas diretamente envolvidas na proteção celular ou fatores de transcrição que controlam grupos específicos de genes regulados pelo estresse. Os produtos destes genes podem participar na formação de moléculas regulatórias, como o hormônio ABA, o etileno e o ácido salicílico (SA). Estas moléculas regulatórias podem iniciar uma segunda parte da sinalização (Xiong *et al.*, 2002b; Mahajan & Tuteja, 2005; Shao *et al.*, 2007).

Existem pelo menos 600 proteínas quinases receptoras no genoma de *Arabidopsis*, e a maioria está ligada à membrana (Shao *et al.*, 2007). É improvável, no entanto, que exista um único sensor que percebe a condição de estresse e controle toda a sinalização subsequente. Um único sensor pode apenas regular ramificações da cascata de sinalização, que são iniciadas por um único aspecto da condição estressante (Xiong *et al.*, 2002b). Portanto, devem existir inúmeros sensores primários que percebem o sinal inicial (Hasegawa *et al.*, 2000). A cascata de eventos de sinalização iniciada pelos sinais secundários (segundo mensageiros e hormônios) pode diferir da sinalização primária tanto no tempo como no espaço. Estes sinais secundários podem tanto diferir na especificidade dos estímulos primários, como podem ser compartilhados por diferentes vias, e podem também estar por trás da interação entre as vias de sinalização para diferentes estresses ou proteção cruzada (Xiong *et al.*, 2002b; Zhu, 2002; Maia, 2004). Portanto uma condição primária de estresse pode ativar vias de sinalização múltiplas diferindo em espaço, tempo e diferentes resultados.

## **1.5. O Estresse Oxidativo nos Vegetais**

### **1.5.1. Espécies Ativas de Oxigênio (AOS)**

A evolução dos organismos que utilizam o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) comoceptor final de elétrons para a respiração foi uma enorme vantagem energética se comparada com a respiração anaeróbica (Scandalios, 1997). No entanto, ao mesmo tempo em que a redução respiratória do  $\text{O}_2$  para a  $\text{H}_2\text{O}$  fornece a energia necessária para a impressionante complexidade dos organismos superiores, ela também pode levar à formação das espécies

ativas de oxigênio (AOS)<sup>6</sup>. Essas espécies são altamente tóxicas e pode levar a destruição de biomoléculas e estruturas celulares (Van Breseugem *et al.*, 2001; Mittler *et al.*, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2007). Estas espécies, como são produtos parciais do metabolismo aeróbico, são produzidas na célula vegetal tanto em condições metabólicas normais, como sob situações de estresse (Buchanam & Balmer, 2005). A FIGURA 6 apresenta as principais AOS encontradas nas células vegetais.

O estresse oxidativo ocorre quando há um sério desequilíbrio, em qualquer compartimento celular, entre a produção das AOS e a defesa antioxidante, causando sérios danos na célula vegetal (Moller, 2001). Acredita-se que a toxicidade desses compostos (AOS) reside na sua habilidade de iniciar cascatas de reações que resultam na produção de espécies destrutivas como peróxidos de lipídeos (Noctor & Foyer, 1998). Elas reagem também, com uma grande variedade de biomoléculas, tais como lipídeos, proteínas, e ácidos nucléicos, que são essenciais à manutenção da integridade das estruturas celulares e, portanto podem causar danos irreversíveis que podem levar à necrose dos tecidos e em último caso à morte da planta (Apel & Hirt, 2004; Foyer & Noctor, 2005). Em humanos, são conhecidos exemplos de desordem metabólica envolvendo formas reduzidas de oxigênio, tais como câncer, artrite e disfunções nervosas e o envelhecimento (Maxwell *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002).

O oxigênio molecular é relativamente não reativo (Becana *et al.*, 2000). Sua ativação é dependente de energia e requer um doador de elétrons (Apel & Hirt, 2004). As etapas subseqüentes de redução de um elétron não são dependentes de energia e podem ocorrer espontaneamente ou necessitam de doadores apropriados de  $e^-/H^+$ . Na célula, íons metálicos de transição ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$ ) e semiquinonas podem agir como doadores de  $e^-$  (Blokhina *et al.*, 2003). A aceitação do excesso de energia pela molécula de  $O_2$  pode levar adicionalmente a formação do oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ), uma molécula altamente reativa se comparado ao  $O_2$  (Vranová *et al.*, 2002; Blokhina *et al.*, 2003; op den Camp *et al.*, 2003). O  $^1O_2$  pode durar até aproximadamente 4  $\mu s$  na água e 100  $\mu s$  em ambientes não-polares. O oxigênio *singlet* pode então transferir sua energia de excitação para outras moléculas biológicas ou reagir com elas, formando então hidroperóxidos. Essa AOS também é continuamente formada durante a fotossíntese, pelo Fotossistema 2 (Apel & Hirt, 2004).

O radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) é um radical livre moderadamente reativo, com uma meia-vida de aproximadamente 2-4  $\mu s$ . No entanto, o superóxido não pode atravessar as membranas biológicas e é prontamente dismutado a  $H_2O_2$ . Caso tal reação não aconteça, essa AOS pode reduzir quinonas e complexos metálicos de transição de  $Fe^{3+}$  e  $Cu^{2+}$ ,

<sup>6</sup> Apesar de amplamente utilizado na literatura o termo ROS (Espécies Reativas de Oxigênio), por definição, é utilizado para denotar espécies com elétrons livres não emparelhados e não se aplicaria ao  $H_2O_2$  e ao oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ). Por isso a preferência pela utilização de *Espécies Ativas de Oxigênio* (AOS)

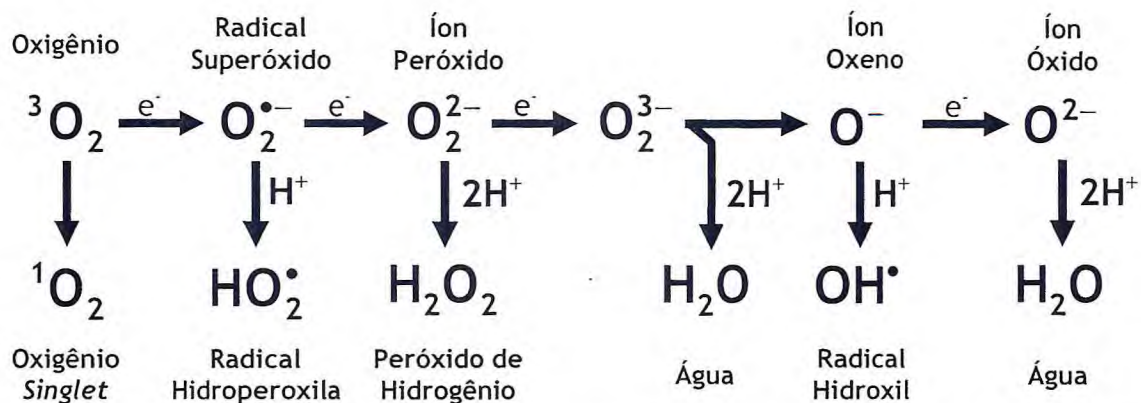


FIGURA 6 – Geração das diferentes AOS por transferência de energia ou reduções seqüenciais univalentes do Oxigênio *triplet* no estado basal. (Adaptado de Apel & Hirt, 2004).

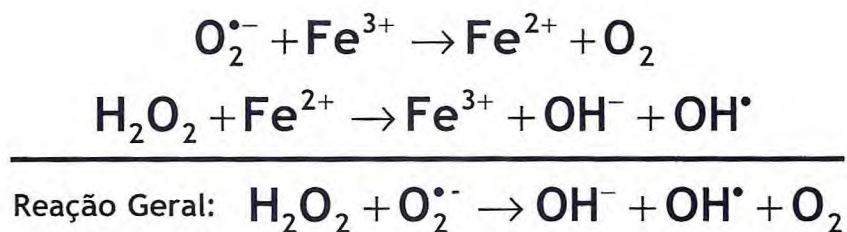


FIGURA 7 – Reações de Fenton ou Haber-Weiss.

afetando, portanto a atividade de metalo-enzimas. Os radicais hidroperóxilas ( $\text{HO}_2^\cdot$ ) que são formados a partir do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por protonação em soluções aquosas pode atravessar as membranas biológicas e subtrair átomos de hidrogênio de ácidos graxos polinsaturados e hidroperóxidos de lipídeos, começando então, a auto-oxidação de lipídeos (Neill *et al.*, 2002).

O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é moderadamente reativo e possui uma relativa longa vida celular que pode atravessar distâncias consideráveis de seu local de produção (Vranová *et al.*, 2002; Bienert *et al.*, 2006). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem capacidade de difundir-se livremente através de determinados tipos de aquaporinas (Henzler & Steudle, 2000; Bienert *et al.*, 2006). Dessa forma, os AOS produzidos nos cloroplastos e nas mitocôndrias, por exemplo, podem afetar outros compartimentos celulares. Tais características fazem dele também um importante sinalizador intracelular, tendo um papel central em várias vias de sinalização (como por exemplo, a da Resposta Hipersensitiva), que levam principalmente a tolerância cruzada (Foyer *et al.*, 1997; Bowler & Fluhr, 2000; Foyer & Noctor, 2000; 2003).

Entre os processos induzidos pelo peróxido de hidrogênio estão: indução de ligações transversas na parede celular, fechamento estomático, expressão de genes relacionados a uma grande variedade de respostas ambientais, biogênese de peroxissomos etc. (Nyathi & Baker, 2006). Além disso, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode também inativar enzimas, como as superóxidos dismutases (Cu/Zn e Fe SODs) e diversas enzimas do ciclo de Calvin (Buchanam & Balmer, 2005), induzir enzimas como as catalases e peroxidases, provocar danos aos ácidos nucléicos e proteínas, iniciar a peroxidação de lipídeos (Neill *et al.*, 2002) e contribuir para a carbonilação de proteínas e oxidação dos resíduos de metioninas e grupos tiol ( $-\text{SH}$ ) das cisteínas (Bienert *et al.*, 2006).

A mais reativa das AOS é o radical hidroxila que formado a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pelas chamadas reações de Haber-Weiss ou de Fenton (FIGURA 7), pela utilização de catalisadores metálicos como o  $\text{Fe}^{2+}$  (Dat *et al.*, 2000; Van Breseugem *et al.*, 2001). O radical  $\text{OH}^\cdot$  pode reagir potencialmente com todas as moléculas biológicas. Como as células não possuem mecanismos enzimáticos para eliminar essa espécie ativa de oxigênio altamente reativa a sua produção em excesso leva por fim à morte da célula (Van Breseugen *et al.*, 2001; Vranová *et al.*, 2002).

### **1.5.2. Sítios de Produção de Espécies Ativas de Oxigênio**

A maioria dos compartimentos celulares tem o potencial de se tornar fonte de AOS. Estima-se que aproximadamente 1% do consumo total de  $\text{O}_2$  dos tecidos vegetais vai para a produção de AOS (Moller, 2001). Além das reações envolvidas no metabolismo normal, assim como a fotossíntese e respiração, as AOS são também produzidas por vias que

aumentam sua atividade, durante os estresses abióticos, como a via que utiliza a enzima glicolato oxidase nos peroxissomos, durante a fotorrespiração. Contudo, novas fontes metabólicas que produzem AOS foram identificadas em plantas. Isso inclui as reações catalisadas por NADPH oxidases, amino-oxidases e peroxidases ligadas à parede celular (Mittler, 2002). A maior parte da produção de AOS na célula vegetal origina-se principalmente de 3 compartimentos: os cloroplastos, as mitocôndrias e os peroxissomos.

### *Cloroplastos*

Durante muito tempo, os cloroplastos foram considerados os principais produtores de AOS nas células vegetais e conseqüentemente, um dos principais alvos dos danos causados por AOS durante condições de estresse (Mittler, 2002). Isto é particularmente devido à série de reações redox que ocorrem nos fotossistemas durante a absorção da energia luminosa e a passagem destes elétrons para um aceptor final, geralmente o CO<sub>2</sub>. Os dois principais processos envolvidos na formação de AOS durante a fotossíntese são: a fotorredução direta do O<sub>2</sub> para o radical superóxido por componentes reduzidos do transporte de elétrons associados com o PSI; e reações ligadas ao ciclo fotorrespiratório, incluindo a RuBisCO no cloroplasto, a oxidase de glicolato e as reações da Catalase – peroxidase nos peroxissomos (Apel & Hirt, 2004).

Quando as plantas estão expostas a estresses ambientais que restringem a disponibilidade de CO<sub>2</sub> dentro da folha (fatores estomáticos) ou que limitam a fixação de CO<sub>2</sub> (fatores não estomáticos)<sup>7</sup>, como realmente ocorre em condições de estresse salino e de seca, principalmente se associados com estresses de alta luminosidade (Mittler *et al.*, 2004) o transporte de elétrons fotossintético torna-se super-reduzido formando radicais superóxidos e oxigênio singlet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) nos cloroplastos (Foyer & Noctor, 2000, 2003; Vranová *et al.*, 2002). Nestas condições, a redução do oxigênio pela reação de Mehler no PSI e a via fotorrespiratória desempenham um crítico papel protetor (Asada, 1999). No entanto, apesar de inúmeras evidências indiretas, não há ainda um consenso quanto ao papel protetor do processo de fotorrespiração na redução excessiva dos fotossistemas (Wingler *et al.*, 2000).

### *Mitocôndrias*

A mitocôndria é considerada o principal compartimento na geração de AOS nas células animais (Maxwell *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002), e em tecidos não-fotossintéticos (Moller, 2001). Nos tecidos fotossintetizantes, devido às maiores contribuições dos cloroplastos e peroxissomos, a formação de AOS pelos complexos da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial vêm sendo considerada de importância secundária (Dutilleul *et al.*,

---

<sup>7</sup> Comentados na Seção 2.4.

2003). Estudos mais recentes, no entanto, têm voltado a atenção para esta organela, principalmente devido ao seu papel crucial na morte celular programada (PCD) (Mittler, 2002) e na sua participação ativa na resistência ao estresse oxidativo induzidos por tratamentos bióticos e abióticos (Dutilleul *et al.*, 2003).

Na mitocôndria, a maioria do oxigênio é metabolizado pela enzima citocromo c oxidase dentro do sistema mitocondrial de transporte de elétrons (CTE), e implica a transferência seqüencial de quatro elétrons para o oxigênio, produzindo água. Nos vegetais, há ainda um sítio adicional de redução de oxigênio na via da oxidase alternativa (AOX) (Maxwell *et al.*, 1999; Moller, 2001), que tem distinção da citocromo oxidase por ser resistente à inibição pelo cianeto. Esta via alternativa, também conhecida como uma via de evasão de energia, segundo Moller (2001), ajuda na minimização da produção de AOS, pela CTE mitocondrial. Quando o crescimento e outros processos que necessitam de energia estão reduzidos ou parados como uma consequência do estresse, a CTE mitocondrial pode se tornar super-reduzida, favorecendo a formação de  $O_2^{\bullet-}$  (Vranová *et al.*, 2002) que é formado pela auto-oxidação destes componentes reduzidos. No geral, os principais geradores desta AOS são o radical Ubiquinona e as NADH desidrogenases (Dat *et al.*, 2000).

#### *Peroxisomos*

Os peroxissomos produzem radicais superóxidos como consequência normal de seu metabolismo. Xantina oxidase, ureato oxidase e NADH oxidase produzem  $O_2^{\bullet-}$  como consequência da oxidação de seus substratos (Vranová *et al.*, 2002). A reação com a xantina oxidase é comumente utilizada em condições *in vitro* como fonte de superóxido, capaz de produzir até um mol de superóxido durante a conversão de xantina em ácido úrico (Del Rio *et al.*, 2002; 2003). O ácido úrico é então oxidado a alantoína, gerando ainda  $H_2O_2$  e  $CO_2$  (Vranová *et al.*, 2002). Há também produção deste radical nas membranas dos peroxissomos, onde foi demonstrada a existência de uma pequena cadeia de transporte de elétrons, necessária para a regeneração do  $NAD^+$  para ser utilizado novamente nos processos metabólicos desta organela (Del Rio *et al.*, 2002; Nyathi & Baker, 2006).

Há muito tempo se sabe que o  $H_2O_2$  é produzido nos peroxissomos, como parte da fotorrespiração, e durante o catabolismo de lipídeos, como derivado da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos. A glicolato oxidase produz  $H_2O_2$  por meio da transferência de dois elétrons do glicolato para o oxigênio. Foyer & Noctor (2003) descreveram os peroxissomos como o principal sítio de produção de  $H_2O_2$  nas plantas  $C_3$  durante a fotorrespiração, e em tais condições a taxa de produção desta AOS nos peroxissomos é aproximadamente 2 vezes maior do que a dos cloroplastos e até 50 vezes maior do que das mitocôndrias. Recentemente, uma oxidase de sulfito também foi encontrada nos peroxissomos de

*Arabidopsis*, que catalisa a reação de oxidação de sulfito, com o O<sub>2</sub> atuando como acceptor de elétrons, e formando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nyathi & Baker, 2006).

#### *Outros compartimentos*

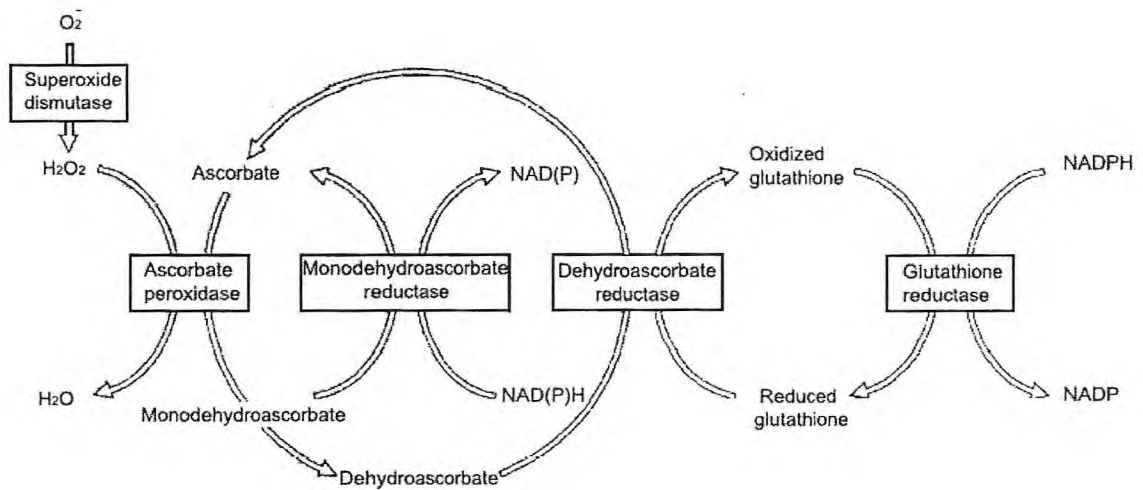
As AOS são geradas nas plantas também na membrana plasmática ou extracelularmente no apoplasto. A enzima oxidase NADPH-dependente (NADPH oxidase) da membrana plasmática têm sido recentemente apontada como uma fonte de AOS para a explosão oxidativa (*oxidative burst*), que é típico de interações incompatíveis planta-patógeno (Lamb & Dixon, 1997). Em adição à NADPH oxidase, peroxidases da parede celular dependentes de pH, oxidases de oxalato e de aminas têm sido propostas como fontes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no apoplasto (Dat *et al.*, 2000).

### **1.5.3. Mecanismos de Defesa Antioxidativa da Célula Vegetal**

As plantas desenvolveram sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos muito eficientes, que permite a eliminação das AOS e a proteção contra danos oxidativos (Inzé & Van Montagu, 1995). A partição entre estes dois sistemas sob condições de estresse pode ser regulada pela concentração de O<sub>2</sub> no sistema (Blokhina *et al.* 2003). A distinta localização subcelular e propriedades bioquímicas das enzimas antioxidantes, seus diferentes padrões de indução de enzima e expressão gênica, e a grande quantidade de eliminadores não-enzimáticos tornam o sistema antioxidante uma unidade muito flexível e versátil que pode controlar a acumulação e desintoxicação temporal e espacial das AOS (Del Rio *et al.*, 2002; Vranová *et al.*, 2002; Mittler *et al.*, 2004).

Antioxidantes como o ácido ascórbico (AsA, vitamina C), glutathiona (GSH),  $\alpha$ -tocoferol e carotenóides ocorrem em altas concentrações nas plantas (Inzé & Van Montagu, 1995; Slesak *et al.*, 2002). Uma alta taxa de AsA reduzido/oxidado e de GSH é essencial para a eliminação das AOS nas células vegetais. Estados reduzidos destes antioxidantes são mantidos pelo Ciclo Ascorbato-Glutathiona (FIGURA 8), que utiliza NADPH como poder redutor (Tsugane *et al.*, 1999; Apel & Hirt, 2004). Em adição, o balanço geral entre os diferentes antioxidantes deve ser firmemente controlado. A importância deste balanço é evidente quando células com uma aumentada biossíntese de glutathiona nos cloroplastos apresentam danos por estresse oxidativo, possivelmente devido a mudanças no estado redox total dos cloroplastos (Creissen *et al.*, 1999). Mutantes com níveis diminuídos de ácido ascórbico são geralmente hipersensíveis a estresses (Conklin *et al.*, 1996).





© 1995 Current Opinion in Biotechnology

FIGURA 8 – O ciclo Ascorbato-Glutationa. O  $H_2O_2$  é removido pela APX, e o ascorbato é regenerado por uma série de reações que envolvem as enzimas redutase de monodesidroascorbato, redutase de desidroascorbato e redutase de glutathione. O ascorbato é oxidado para monodesidroascorbato. Se este não é rapidamente reduzido novamente à sua forma reduzida pela redutase de monodesidroascorbato, ele é convertido espontaneamente a desidroascorbato. Este último é reciclado a ascorbato, utilizando glutathione reduzida, que é regenerada através da ação da redutase de glutathione em uma reação dependente de NADPH (Adaptado de Inzé & Van Montagu, 1995).

O sistema de defesa antioxidativo enzimático das plantas inclui diversas enzimas antioxidantes nos diferentes compartimentos celulares. Dentre as principais enzimas podemos citar as dismutases de superóxido (SOD; EC 1.15.1.1), as peroxidases de ascorbato (APX; EC 1.11.1.1) e as catalases (CAT; 1.11.1.6) que juntamente com outras enzimas do ciclo ascorbato-glutationa promovem a eliminação das AOS (Cavalcanti *et al.*, 2004; 2007). O grau do estresse oxidativo em uma célula é determinado pela quantidade de superóxido,  $H_2O_2$  e radicais hidroxilas. Portanto, o balanço das atividades da SOD, APX e CAT é crucial na supressão dos níveis tóxicos de AOS na célula (Apel & Hirt, 2004). Nos últimos anos, um grande número de estudos tem focalizado no balanço dessas atividades, nas diferentes organelas celulares.

Segundo Alscher *et al.* (2002), dentro da célula, as SODs constituem a primeira linha de defesa contra os AOS. Estas proteínas pertencem ao grupo de metalo-enzimas que protegem as células dos radicais superóxidos, catalisando a dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$  (Wu *et al.*, 1999; Van Breusegem *et al.*, 2001). O radical  $O_2^{\bullet-}$  é produzido em qualquer localização intracelular onde exista um transporte de elétrons, e, portanto, a ativação do  $O_2$  pode ocorrer em diferentes compartimentos celulares (Dat *et al.*, 2000), incluindo mitocôndria, cloroplastos, microssomos, glioxissomos, peroxissomos, apoplasto e no citossol. Portanto não é surpresa o fato das SODs estarem presentes em praticamente todas as regiões da célula. Além disso, foi provado que as membranas biológicas são impermeáveis a moléculas de  $O_2$  carregadas, daí a importância da presença destas dismutases onde há a presença de  $O_2^{\bullet-}$ . As SODs são classificadas, de acordo com o seu metal cofator, em três grupos: FeSOD, presente nos cloroplastos; MnSOD, presentes nas mitocôndrias e peroxissomos; e as Cu/Zn-SODs, presentes nos cloroplastos, no citossol e possivelmente no espaço extracelular (Alscher *et al.*, 2002; Cavalcanti, 2002).

As APXs são consideradas as enzimas mais importantes na eliminação de  $H_2O_2$  no citossol e nos cloroplastos (Inzé & Van Montagu, 1995; Asai *et al.*, 2004). As APXs utilizam o ascorbato como seu doador de elétrons específicos para reduzir  $H_2O_2$  a água, constituindo parte do ciclo conhecido como ciclo da ascorbato-glutationa ou ciclo Halliwell-Asada (Inzé & Van Montagu, 1995; Shigeoka *et al.*, 2002; Davletova *et al.*, 2005; D'arcy-Lameta *et al.*, 2006) (FIGURA 8). De acordo com del Rio *et al.*, (1998) e Polle (2001), este ciclo é uma via eficiente de células de plantas na remoção do  $H_2O_2$  em determinados compartimentos, nos quais não existe e nem pode existir catalase presente, como por exemplo, no Cloroplasto (Mittler, 2002).

Este ciclo faz uso dos antioxidantes não enzimáticos como o ascorbato e a glutaciona em uma série de reações catalisadas por quatro enzimas antioxidativas, e está bem demonstrado em cloroplastos, citossol e mitocôndrias de nódulos radiculares (Polle, 2001), e

em peroxissomos e mitocôndrias purificadas de folhas de ervilha (Jiménez *et al.*, 1997). As isoenzimas de APX são distribuídas em pelo menos quatro compartimentos celulares distintos: no estroma e ligadas à membrana dos tilacóides dos cloroplastos; ligada à membrana (mAPX) nos microcorpos, incluindo glioxissomos e peroxissomos; e no citossol (cAPX) (Shigeoka *et al.*, 2002; D'arcy-Lameta *et al.*, 2006). Há ainda isoformas de APX e de outras enzimas do ciclo ascorbato-glutationa na mitocôndria (mitAPX) (Chew *et al.*, 2003). Todas estas isoenzimas têm uma alta especificidade pelo ascorbato como doador de elétrons.

A catalase é uma enzima que contém um grupamento heme em sua estrutura que catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Zámocky & Koller, 1999). A enzima é encontrada em todos os eucariotos aeróbios e é muito importante na remoção do peróxido de hidrogênio produzido nos peroxissomos e glioxissomos pelas oxidases envolvidas na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, nas reações do glioxilato (fotorrespiração) e no catabolismo das purinas (Van Breusegem *et al.*, 2001). Múltiplas formas de catalase têm sido descritas em muitas espécies de plantas. Em milho, foram encontradas três isoformas (CAT-1, CAT-2 e CAT-3) cujos genes estão em cromossomos separados e são expressos distintamente com regulações independentes (Van Breusegem *et al.*, 2001) e diferentes localizações: CAT-1 e CAT-2 localizadas nos peroxissomos e no citossol, enquanto que CAT-3 é provavelmente localizado na mitocôndria (Polidoros & Scandalios, 1997). Van Breusegem *et al.* (2001) sugerem, ainda, as catalases como as principais enzimas de remoção de  $H_2O_2$  em plantas, discordando da afirmativa de Inzé & Van Montagu (1995) e Asai *et al.* (2004) que defendem esse papel para a APX.

Um grande número de outras enzimas também está envolvido na defesa antioxidativa. As Peroxidases de Guaiacol (POXs), da classe III de peroxidases de plantas, são encontradas em vários compartimentos celulares como o citossol, vacúolo, apoplasto e parede celular (Maia, 2004; Mittler *et al.*, 2004). No entanto, ainda não é completamente claro o seu envolvimento na remoção das AOS, já que esta enzima também está envolvida no processo de lignificação e parada no crescimento em situações de estresse (Cavalcanti *et al.*, 2007). As peroxidases de glutatona (GPX), as glutatonas peroxidases de hidroperóxidos de lipídeos (PhGPX) assim como o antioxidante não enzimático  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) estão envolvidos com a proteção da membrana plasmática contra as AOS. Além destas enzimas, proteínas de ligação a metais, como a ferritina, que seqüestram íons metálicos, ajudam na prevenção da formação do radical  $OH^\bullet$  via reações de Fenton ou Haber-Weiss (Mittler *et al.*, 2004)

#### 1.5.4. Redundância e troca de informações entre os mecanismos antioxidantes enzimáticos

Apesar de muitos dos sistemas antioxidantes enzimáticos, em cada organela, dentro da célula, estarem bem caracterizados qualitativamente, pouco se sabe sobre a troca de informações e homeostase redox entre as diferentes organelas (Dutilleul *et al.*, 2003). Eles funcionam independentemente em diferentes compartimentos celulares ou cooperam entre si (Asai *et al.*, 2004)? Recentes estudos em *Arabidopsis* têm sugerido que a coordenação entre os diferentes compartimentos da rede de remoção de AOS é complexa (Rizhsky *et al.*, 2003). Karpinski *et al.* (1997), Pnueli *et al.* (2003) e Yoshimura *et al.* (2000), ao aplicarem estresse de alta luminosidade em *Arabidopsis*, relataram uma indução das enzimas de defesa antioxidativa do citossol e não uma indução das enzimas de defesa do cloroplasto, ainda que a maioria das AOS produzidas durante o estresse de luz sejam geradas no cloroplasto e nos peroxissomos (Asada, 1999).

Asada (1999) e Polle (2001) afirmaram a partir de seus estudos que os cloroplastos são organelas bem equipadas para a eliminação do  $O_2^{\bullet-}$  e do  $H_2O_2$  produzidos durante a fotossíntese em plantas crescendo sob condições controladas ou sujeitas a estresse de alta luminosidade. No entanto, resultados de Mano *et al.* (2001) demonstraram que as APXs do cloroplasto são inativadas pelo  $H_2O_2$ . Pnueli *et al.* (2003) reduziram a expressão da APX citossólica (APX1) pela técnica de nocaute de genes (gene *knockout*) e verificaram que na ausência do gene APX1 a atividade fotossintética foi suprimida, sugerindo que a APX citossólica pode ser essencial para a proteção dos cloroplastos durante o estresse de luminosidade. Houve também uma supressão da expressão de catalases.

Davletova *et al.* (2005), a partir de seus resultados, também observaram que na ausência da APX1 citossólica (também por nocaute do gene APX1), o sistema de eliminação de  $H_2O_2$  dos cloroplastos de *Arabidopsis* sofre um completo colapso, e há um aumento dos níveis de  $H_2O_2$ , a ocorrência de oxidação de proteínas presentes no cloroplasto e uma diminuição da fotossíntese. Contraditoriamente, Asai *et al.* (2004), trabalhando com o mesmo ecotipo de *Arabidopsis* e com a mesma técnica, observaram que outros sistemas antioxidantes compensam a ausência da APX citossólica, como indica o aumento na expressão de catalases.

Plantas de *Arabidopsis* com ausência de expressão de APX do estroma e mitocondrial não mostraram um aumento da produção de  $H_2O_2$ , nem na oxidação de proteínas e não apresentaram redução na atividade fotossintética, mostrando que essas proteínas não possuem grande importância na proteção dos cloroplastos contra danos oxidativos, sendo a APX citossólica suficiente para este papel (Davletova *et al.*, 2005). Curiosamente, plantas de

fumo transformadas com o mRNA antisenso da APX citossólica, da catalase e de ambas enzimas apresentaram respostas contrastantes e inesperadas (Rizhsky *et al.*, 2002). Quando comparadas a plantas com supressão de CAT, plantas com ausência de ambas CAT e APX foram menos sensíveis aos danos oxidativos. Os autores justificaram tais diferenças por: uma diminuição na atividade fotossintética e conseqüente menor produção de AOS; e por uma maior atividade da enzima redutase do monodehidroascorbato que atua em uma regeneração mais rápida do ascorbato reduzido que pode reagir não enzimaticamente com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As plantas que não possuíam apenas a CAT foram ainda mais sensíveis do que as plantas com ausência de APX citossólica (Rizhsky *et al.*, 2002).

A estratégia de plantas deficientes em CAT, através de transformação genética com o mRNA antisenso, também foi utilizada por Dat *et al.* (2003) e Vandenabeele *et al.* (2004). Os primeiros relataram que plantas transgênicas de fumo com apenas 10% da atividade de catalase de plantas controle apresentaram sintomas de morte celular programada quando submetidas a estresse de alta luminosidade. A morte celular, no entanto, era inibida se antioxidantes, como a própria enzima CAT, ascorbato e glutathiona, fossem injetados antes do estresse. Após iniciado o estresse, o mesmo efeito não era observado. Plantas de *Arabidopsis* com deficiência na CAT-2 tinham maior sensibilidade e apresentaram sintomas de PCD, quando submetidas aos estresses de ozônio e de alta luminosidade. Quanto menor era a atividade de Catalase em relação a plantas não-transformadas, maior era a intensidade dos sintomas e conseqüentemente a sensibilidade (Vandenabeele *et al.*, 2004). Ambos os autores evidenciaram que o excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziu mudanças na expressão de vários genes.

A ausência de Catalase em plantas de soja induziu um grande aumento da atividade de APX, maiores concentrações de glutathiona e ascorbato, e expressaram uma isoforma de Mn-SOD quando comparadas às plantas controle. Estes resultados podem sugerir que os diferentes sistemas antioxidantes agem redundantemente dentro da célula vegetal, podendo haver compensação caso ocorra ausência ou depleção de algum deles (Palatinik *et al.*, 2002). Willekens *et al.* (1997), relataram que plantas transgênicas de fumo com atividade reduzida da CAT1 apresentaram uma maior atividade de APX e GPX. No entanto, em condições de alta luminosidade, as plantas se mostraram sensíveis ao estresse oxidativo e apresentaram comprometimento do ciclo ascorbato-glutathiona. De uma forma elegante, os autores mostraram que a aplicação exógena de catalase diminui os danos ocasionados pelo estresse oxidativo, mostrando que esta enzima pode ser um dreno celular para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e é de fundamental importância para resistência ao estresse em plantas C<sub>3</sub>, não se limitando apenas ao processo fotorrespiratório (Willekens *et al.*, 1997).

Resultados semelhantes ao de plantas transgênicas com CAT ausente foram relatados por Gechev e colaboradores. Eles observaram que plantas de fumo pré-tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se mostraram mais resistentes ao estresse oxidativo induzido por tratamentos com alta luminosidade e 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT - inibidor específico de catalases), pois um menor nível na peroxidação de lipídeos foi evidenciado. Nessas plantas, a atividade e a expressão da peroxidase de ascorbato era mais do que 2 vezes maior do que as plantas não previamente tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mostrando que essa AOS, em pequenas quantidades, pode potencializar as defesas antioxidativas (Gechev *et al.*, 2002). Estes mesmos autores mostraram que o 3-AT induz uma explosão oxidativa e causa a indução ou a repressão de vários genes regulados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, levando à morte celular programada. Esta não estaria associada apenas à inibição da enzima catalase, e sim por uma amplificação da sinalização causada por esta AOS (Gechev *et al.*, 2005).

Dutilleul *et al.* (2003), trabalhando com um mutante de *Nicotiana sylvestris* que possui um defeito no complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, defenderam a hipótese de que a organela responsável pela homeostase redox celular e pela resistência ao estresse seria a mitocôndria. Apesar da perda de função do complexo I, as plantas mantiveram o fluxo respiratório por meio das vias alternativas. Esse reajuste respiratório está associado com uma redistribuição temporal e espacial do sistema antioxidativo acoplado com uma capacidade antioxidante aumentada, que pode esclarecer a resistência aumentada ao estresse oxidativo induzido por ozônio ou por infecção pelo vírus do mosaico do fumo (TMV). No entanto, houve também um aumento da atividade e expressão da APX citossólica, o que pode ressaltar, também, a importância do citosol na defesa antioxidativa.

Realizando estudos comparativos com uma cultivar de tomate sensível à salinidade e um tipo selvagem resistente, Mittova *et al.* (2003) consideraram que as diferenças na sensibilidade ao sal eram provavelmente devidas a uma maior atividade das defesas antioxidantes de organelas como as mitocôndrias e peroxissomos. A atividade de enzimas como a APX, a MDHAR (monodehidroascorbato redutase), SOD e CAT (no caso dos peroxissomos) dessas organelas apresentavam-se aumentadas na cultivar resistente quando comparadas à cultivar sensível. Quando discos foliares de ambas cultivares foram tratados com um inibidor da enzima alternativa oxidase, os discos da cultivar resistente se mostraram mais sensíveis. No entanto, essa sensibilidade era diminuída caso o tratamento com o inibidor fosse realizado junto com o tratamento com NaCl. O mesmo comportamento foi observado mediante tratamento com o 3-AT.

A partir do que foi relatado acima, algumas questões centrais podem ser levantadas: o sistema antioxidante da célula age em concerto, como um todo, ou é apenas uma soma

das atividades antioxidativas de cada compartimento? A aparente redundância reflete um perfeccionismo do sistema ou é uma pura necessidade? Diferenças transientes no estado redox de cada compartimento geram sinais únicos ou específicos para o compartimento em questão? As respostas para estas perguntas têm recebido foco de grande parte das pesquisas atuais.

Mais do que um sistema "projetado" para extinguir as AOS, o sistema antioxidante da célula pode ter evoluído para permitir o ajustamento de seu estado redox e possibilitar a sua utilização com um sinal (Mittler *et al.*, 2004). Sabe-se que a acumulação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é percebida pela planta como um sinal de mudança ambiental, e como uma molécula de fácil difusão, ela pode alertar o metabolismo para a presença de ameaças à sobrevivência da planta (Noctor & Foyer, 1998), atuando diretamente sobre a expressão gênica (Buchanan & Balmer, 2005). Durante muito tempo, os estudos sobre o estresse oxidativo nas plantas focalizaram na atividade das enzimas e de certa forma superestimaram a sua importância. Quando um aumento não era observado, logo se concluía que a planta em questão falhou em se aclimatar às condições de estresse. Segundo Noctor & Foyer (1998), existe uma falta de evidências concretas para uma indução em concerto das atividades das enzimas antioxidativas sobre uma condição de estresse, já que condições diferentes de estresses devem envolver processos distintos e, conseqüentemente, provocar diferentes respostas (Mittler *et al.*, 2004). Provavelmente o problema não está na célula vegetal, mas nas nossas pressuposições.

## **1.6. O Modelo Vegetal**

O feijão caupi ou feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é amplamente cultivado no Norte e Nordeste como fonte de proteína em pequenas áreas, utilizando mão-de-obra familiar e técnicas rudimentares de cultivo (Ehlers & Hall, 1997). O estado do Ceará já foi o maior produtor brasileiro, alcançando, aproximadamente, 20% da produção total do País (IBGE, 1988). De acordo com Cardoso (2000), o feijão caupi se desenvolve no semi-árido brasileiro, em geral, sob condições ambientais adversas, principalmente deficiência hídrica, temperaturas e luminosidade elevadas e salinização dos solos. Além disso, a recente utilização da prática de irrigação em algumas áreas de produção vem aumentando consideravelmente os riscos de salinização dos solos devido a problemas com a qualidade da água usada para irrigação e das altas taxas de evaporação da água do solo (Cavalcanti, 2002).

Recentemente, estudos conduzidos pelo Laboratório de Metabolismo de Plantas da UFC demonstraram que no feijão caupi a redução no potencial hídrico induz aumento na

resistência estomática, acarretando redução na taxa de fotossíntese e incremento na produção líquida de radicais derivados do oxigênio nas folhas (Souza *et al.*, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2004) e raízes (Cavalcanti *et al.*, 2007). Esse aumento de AOS media muitos dos danos provocados pela seca e salinidade nesta cultura. Foi verificado também, um aumento na atividade de enzimas do tipo peroxidases, que aparentam estar relacionadas tanto a processos de lignificação e parada no crescimento como na própria eliminação das AOS (Cavalcanti, 2002; Cavalcanti *et al.*, 2004; 2007). No entanto, sob condições de luminosidade naturais, a enzima catalase se mostrou sensível, reduzindo sua atividade (Cavalcanti, 2002), enquanto que a enzima peroxidase de ascorbato se mostrou inalterada (Freitas, 2006).

Em folhas de plantas C<sub>3</sub>, como o feijão caupi, condições que favorecem a atividade oxigenase da RuBisCO, como alta luminosidade e salinidade, comumente encontradas em nossa região, a fotorrespiração é provavelmente o processo que mais rapidamente gera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos peroxissomos (Foyer & Noctor, 2000; Cavalcanti *et al.*, 2004). A enzima catalase tem um papel fundamental na remoção de AOS dos peroxissomos, principalmente as provenientes do processo de fotorrespiração. No entanto, foi mostrado por recentes trabalhos do citado grupo, que o sistema SOD-POX-CAT não se mostrou efetivo na remoção das AOS geradas nas folhas pelas condições de alta salinidade (Cavalcanti *et al.*, 2004). Foi observado também, que em condições de luminosidade normais, plântulas de feijão caupi pré-tratadas com sal tiveram seu desempenho melhorado em condições de estresse oxidativo gerado por seca (Maia, 2004).



## 2. JUSTIFICATIVA

A cultura do feijão caupi [ *Vigna unguiculata* (L.) Walp] representa a principal fonte de proteínas de origem vegetal para a população do Norte e Nordeste do Brasil (Silveira *et al.*, 1999; Cavalcanti, 2002). Nas condições de cultivo da espécie no semi-árido, prevalecem condições ambientais adversas de deficiência de água, salinidade e altas condições de luminosidade. Em geral, estes fatores, os quais interagem fortemente, determinam significativas reduções no crescimento das plantas (Bohnert *et. al.*, 1995). A solução do primeiro problema (deficiência hídrica), por meio da irrigação com água de baixa qualidade (concentrações elevadas de sais), associada com práticas agrícolas inadequadas, poderá agravar o segundo, o da salinidade (Flowers, 2004). Na realidade, o déficit hídrico e a salinidade representam os dois principais fatores de estresse ambiental que limitam a agricultura no mundo (Mahajan & Tuteja, 2005).

As espécies vegetais em geral, e as do semi-árido em particular, sofrem diversos tipos de estresses secundários quando cultivadas sob condições de seca, excesso de sais no solo e alta luminosidade. Portanto, essas condições induzem um segundo tipo de estresse nas plantas: o estresse oxidativo causado pelo excesso de radicais ativos de oxigênio (AOS). Para eliminar essas espécies tóxicas é necessária uma coordenação da expressão de enzimas que catalisam reações de eliminação (antioxidativas) ou outras envolvidas com a síntese de substâncias redutoras (antioxidantes) em níveis capazes de atenuar ou eliminar os danos oxidativos (Foyer & Noctor, 2000). Algumas evidências experimentais mostram que essa resposta antioxidativa pode estar positivamente relacionada com a resistência das plantas aos estresses hídrico e salino (Cavalcanti *et al.*, 2004; Silveira *et al.*, 2005).

Dessa maneira, genótipos que apresentam maior efetividade na expressão de proteínas (enzimas) ligadas com a defesa antioxidante tais como peroxidases de fenol, peroxidases de ascorbato, peroxidases de glutathione, dismutases de superóxido e catalases poderiam ser mais resistentes aos fatores de estresse abióticos. Apesar do mecanismo geral de defesa antioxidante de plantas já estar bem caracterizado em termos bioquímicos e moleculares (Foyer & Noctor, 2003), muitas questões ainda permanecem em aberto quanto à fisiologia da planta exposta a múltiplas condições de estresse ambiental.

A partir de estudos recentemente conduzidos, foi verificado que o sistema de defesa antioxidativo do feijão caupi é afetado por condições de estresses ambientais como seca, salinidade e alta luminosidade (Cavalcanti, 2002; Cavalcanti *et al.* 2004; Maia, 2004; Souza *et al.*, 2004; Freitas, 2006). No entanto, tais estudos ainda não foram conclusivos no que diz respeito às seguintes questões: as respostas antioxidativas do feijão caupi são comuns a todos os estresses ambientais ou são estresse-específicas? Os danos oxidativos observados

são devidos à repressão de algum sistema enzimático? Qual sistema antioxidativo pode ser potencializado para diminuição de danos em uma determinada situação de estresse? Portanto, há uma necessidade proeminente de estudos, como a presente proposta, que têm como objetivo oferecer respostas a tais perguntas.

A escolha dos estresses hídrico e salino como fatores ambientais de estresse a serem estudados é baseada no fato de que estes são as fontes naturais mais comuns de estresse oxidativo, sendo, portanto, de significativa relevância biológica (Gechev *et al.*, 2002). Além disso, estas estão provavelmente dentre as principais causas que afetam a produtividade de culturas como o feijão caupi em regiões semi-áridas como o Nordeste brasileiro (Cavalcanti *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2004).

Mesmo sendo observada a existência de inúmeros estudos com abordagem e linha científica semelhantes, envolvendo outras espécies vegetais, ainda se tem a necessidade de ampliação de tal conhecimento para uma melhor caracterização das respostas dos vegetais como um todo. As respostas encontradas em modelos mundialmente estudados como *Arabidopsis* e *Nicotiana tabacum* não podem ser consideradas como regra para todas as outras espécies. Estudos em outras espécies possuem uma grande importância científica, contribuindo para o melhor entendimento das diferentes respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares dos vegetais.

A presente proposta de estudo se propõe a avaliar as respostas ao estresse oxidativo em feijão caupi, induzido por condições de estresse hídrico e salino aliados com altas luminosidades e temperaturas, nos níveis fisiológicos (parâmetros fisiológicos), bioquímicos (atividade de enzimas antioxidantes, concentração de AOS e de antioxidantes) e moleculares (expressão de mRNAs de enzimas antioxidantes). O presente trabalho focalizará na interação entre os sistemas de defesa enzimáticos dos compartimentos celulares como peroxissomos e citossol, e na contribuição efetiva das enzimas peroxidases de ascorbato (APX) e catalases (CAT).

Portanto, o presente estudo tem como um dos seus principais objetivos contribuir para o conhecimento científico das respostas antioxidativas dos vegetais e para fornecer novas informações que auxiliarão para o melhoramento de uma cultura inserida em um contexto sócio-econômico regional, como o feijão caupi.

### 3. HIPÓTESES

Partindo do conhecimento de que na célula vegetal há redundância nos diferentes mecanismos enzimáticos de defesa contra o estresse oxidativo e que este é um dos principais efeitos tóxicos provocados pelos estresses hídrico e salino, acredita-se que há uma interação e complementação entre estes diferentes sistemas na resposta das plantas de feijão caupi ao estresse oxidativo. Estas respostas são desencadeadas tanto no aspecto fisiológico (respostas estomáticas, acumulação de solutos), molecular (na expressão dos genes para CAT e APX), como no metabólico, consistindo em uma regulação entre as atividades destas enzimas.

Mesmo com a redundância entre a atividade das enzimas eliminadoras de  $H_2O_2$ , catalase e peroxidase de ascorbato, acredita-se que na ausência ou diminuição na atividade de alguma delas, sob condições de estresse ambiental, não existe compensação por parte da outra enzima, aumentando o nível intracelular de AOS e conseqüentemente provocando danos oxidativos.

Além das hipóteses acima abordadas, os seguintes questionamentos também estão sendo levantados no presente trabalho:

- Dentre as enzimas eliminadoras de  $H_2O_2$ , CAT e APX, qual se apresenta mais ativa no estresse oxidativo, induzido por estresse hídrico e salino, sob condições de alta temperatura e luminosidade?
- A ausência da atividade de uma das referidas enzimas provoca aumento na atividade e expressão do mRNA da outra enzima, sob as condições estressantes?
- Quais os efeitos específicos dos estresses hídrico e salino na atividade das enzimas SOD, CAT e APX?
- Que mudanças ocorrem no nível de ascorbato reduzido quando há ausência da atividade de CAT?

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral

Elucidar a interação e a importância dos diferentes mecanismos enzimáticos de eliminação do  $H_2O_2$  em folhas de feijão caupi, sob condições de estresse oxidativo, induzido por deficiência hídrica e salinidade, relacionando-as com os danos oxidativos apresentados pelas plantas. Estabelecer relações entre a atividade dos sistemas enzimáticos da catalase e da peroxidase de ascorbato, e quais os efeitos na expressão de seus respectivos mRNAs.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar as taxas de transpiração e condutância estomática de plantas de feijão caupi durante a exposição ao estresse hídrico induzido por PEG e ao estresse salino em diferentes tempos de duração;
- Avaliar parâmetros fisiológicos destas plantas como conteúdo relativo de água, percentual de umidade e potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) de tecidos foliares e o conteúdo de  $Na^+$  de tecidos foliares;
- Verificar os danos oxidativos em lipídeos;
- Determinar a atividade das enzimas SOD, APX e CAT, bem como os conteúdos de  $H_2O_2$  e de ascorbato reduzido ( $AsA_{red}$ ) em tecidos foliares de plantas de feijão caupi submetidas aos estresses hídricos e salinos combinados com a aplicação de 3-AT;
- Avaliar a importância da catalase, por meio da inibição de sua atividade, na proteção das plantas de feijão caupi contra os danos oxidativos, como a peroxidação de lipídeos, causados por condições de estresses hídrico e salino;
- Avaliar a importância da Peroxidase de Ascorbato na proteção das plantas de feijão caupi contra os danos oxidativos, como a peroxidação de lipídeos;
- Analisar por meio da técnica de imunoblot a presença de diferentes isoformas da enzima CAT;
- Verificar o efeito das diferentes combinações de tratamento na expressão dos mRNAs das enzimas CAT e cAPX, por meio da técnica de RT-PCR quantitativo (*real-time* RT-PCR).

## 5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Para testar as hipóteses levantadas, foi criada uma abordagem experimental envolvendo diferentes agentes para indução do estresse osmótico. A intenção foi de verificar se as respostas dos sistemas antioxidantes de catalase e peroxidase de ascorbato são similares ou são estresse-específicas. Para isso, foi escolhido o estresse hídrico induzido por Polietilenoglicol (PEG-6000) e o estresse salino, em uma fase de manifestação dos efeitos iônicos, a Fase II descrita por Munns (2005). Além destes diferentes agentes, duas condições ambientais foram testadas: uma em condições controladas de temperatura e luminosidade, em uma câmara de crescimento; e a outra em condições de casa de vegetação, com altas temperaturas e luminosidade, simulando as condições climáticas típicas do semi-árido nordestino. Como o feijão caupi é uma espécie de metabolismo  $C_3$ , estas duas diferentes condições foram testadas com o objetivo de evidenciar diferenças entre as respostas dos sistemas antioxidantes, associadas ou não ao processo de fotorrespiração.

Um grande número de estudos tem utilizado soluções do composto PEG para simular o efeito do estresse hídrico nas plantas (Money, 1989; Umezawa *et al.*, 2002; Türkan *et al.*, 2005). Existe uma série de dificuldades para a manutenção de um potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) fixo para estudos com plantas realizados em solos, e caso o objeto de estudo sejam as raízes, a amostragem é muitas vezes lenta e laboriosa, e os tecidos podem apresentar contaminações ou danos devido à retirada do substrato (Kaufmann & Eckard, 1971; Nepomuceno *et al.*, 1998; Verslues *et al.*, 2006). O PEG é um polímero não-iônico, de longa cadeia, inerte e que não é absorvido pelas raízes. A sua fórmula geral é:  $\text{HOCH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2)_x \text{CH}_2\text{OH}$  (Steuter *et al.*, 1981). PEGs a partir de massa molecular 3000 (Amplitude de massa: 2700-3300) aparentemente já não são absorvidos pelas células das plantas, permanecendo, quando muito no apoplasto (Mexal *et al.*, 1975; Yeo & Flowers, 1984).

O PEG-6000 (Massa Molecular entre 6000 – 7500) é o mais adequado para estudos em plantas do que outros PEGs de menor massa molecular, devido à sua maior amplitude de potenciais osmóticos e por apresentar menor viscosidade na solução, se comparado aos de maiores pesos moleculares (Michel & Kaufmann, 1973; Money, 1989; Büssis *et al.*, 1998). Alguns autores reportaram efeitos tóxicos nas plantas causados por PEG, no entanto, a solução de PEG foi aplicada durante horas de maior luminosidade. Nenhum efeito tóxico de PEG foi relatado quando este foi aplicado durante períodos escuros ou de menor luminosidade (Nepomuceno *et al.*, 1998). Uma outra característica das soluções nutritivas contendo PEG é a diminuição na quantidade de oxigênio disponível para os tecidos radiculares e algumas espécies podem, portanto, sofrer de deficiência de  $\text{O}_2$  quando cultivadas nestas soluções. Entretanto, esta deficiência só é observada em maiores

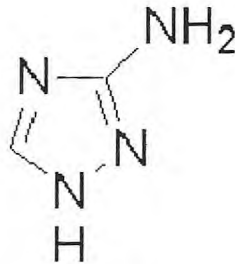
concentrações de PEG e pode ser facilmente superada a partir de procedimentos de aeração (Mexal *et al.*, 1975). Para evitar tais efeitos adversos, no presente estudo a aplicação do PEG foi realizada em horas de baixa luminosidade e as raízes foram submetidas à aeração forçada.

Muitos estudos de estresse hídrico, no entanto, dão preferência a utilização do NaCl. Isto é principalmente devido ao fato de as respostas das plantas ao sal e à seca serem intimamente relacionadas, e os mecanismos de ação destes estresses se sobrepõem em muitos níveis. De acordo com Zhu (2002), de um ponto de vista prático, o estresse salino pode ser imposto de uma maneira mais fácil e precisa em condições de laboratório. Segundo Munns (2002; 2005) o estresse salino induz primeiramente um efeito osmótico, e depois um efeito iônico, específico da salinidade, devido à passagem dos íons salinos para o interior das células. As estratégias fisiológicas exibidas pelo feijão caupi nos estágios iniciais do estresse salino são extremamente semelhantes ao do estresse de seca (Cavalcanti *et al.*, 2004). Portanto, nos experimentos realizados com o NaCl, foi escolhido um estágio onde já se pudesse observar os efeitos iônicos causados por este tratamento.

Além dos tratamentos de PEG e NaCl, as plantas de feijão caupi foram tratadas, isoladamente ou em combinação, com o 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) (FIGURA 9), um composto químico base para um conhecido herbicida, o amitrol. Este composto é solúvel em água, extremamente móvel nos tecidos do xilema e do floema em uma grande variedade de espécies vegetais, além de relativamente não-seletivo na sua fitotoxicidade (Lichtner, 1983). Quando aplicado em doses sub-letais, este composto induz clorose sem nenhum efeito morfogenético (Vivekanandan & Gnanam, 1975). Trabalhos mais antigos, da década de 50 até o início da década 80, relatam a ação deste herbicida em processos metabólicos como a biossíntese de clorofilas e porfirinas, nas funções exercidas por cátions, na síntese de ácidos nucléicos e proteínas, e na interrupção do metabolismo do aminoácido histidina (Racusen, 1958; Vivekanandan & Gnanam, 1975, Lichtner, 1983).

A sua principal ação metabólica, no entanto, é uma forte indução da acumulação de  $H_2O_2$  dentro da célula, por meio da inibição da enzima catalase (Havir, 1992; Gechev *et al.*, 2002; 2005). Esta inibição é irreversível e para a sua ocorrência é necessária a ligação do  $H_2O_2$  ao grupo heme da catalase, embora a ligação do inibidor seja na própria proteína (na histidina 74 da catalase de fígado) (Margoliash & Novogrodsky, 1958; Margoliash *et al.*, 1960 *apud* Havir, 1992). Devido a sua semelhança com o aminoácido histidina, acreditava-se que sua entrada na célula era por meio dos sistemas carreadores deste aminoácido (McDaniel *et al.*, 1982). No entanto, estudos de transporte e translocação mostraram que a entrada deste inibidor aparentemente é por transporte passivo, sem a mediação de proteínas carreadoras (Singer & McDaniel, 1982; Lichtner, 1983). O 3-AT é facilmente absorvido pelas plantas seja

por aplicação direta nas folhas ou suplementado no meio de crescimento (Gechev *et al.*, 2005). Como um dos objetivos do presente estudo é verificar a importância da catalase na resposta antioxidante de tecidos foliares de feijão caupi, utilizou-se uma abordagem de pulverização da parte aérea com uma solução de 3-AT na presença de 0,01% de Triton X-100.



3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT)

FIGURA 9 – Fórmula estrutural do inibidor de CAT, 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) utilizado no presente estudo.

A partir das informações acima, o presente estudo foi dividido em 3 experimentos, envolvendo os estresses hídrico e salino, combinados ou não com a aplicação de 3-AT. O desenho experimental foi realizado de uma maneira onde os efeitos de cada estresse possam ser isolados. Objetiva-se obter, a partir de todos os parâmetros analisados, uma visão geral das respostas antioxidativas do feijão caupi, bem como qual, entre os sistemas de eliminação de  $H_2O_2$  estudados, é mais atuante em determinadas situações de estresse. Em seguida, estão descritos a obtenção das plantas e o desenho dos experimentos realizados.

### 5.1. Material Vegetal

Nos experimentos que se seguem, foram utilizadas sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. "Pitiúba", que estão disponíveis no Banco de Germoplasma do Departamento de Sementes da Universidade Federal do Ceará. A cultivar encontra-se registrada como CE-31 no livro de registro do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, desde 1965, proveniente da cidade de Pentecoste, Estado do Ceará, Brasil. As sementes foram selecionadas e armazenadas em frascos hermeticamente fechados, de cor âmbar, contendo sílica gel e forrado com papel de filtro, ao fundo. Os experimentos foram realizados com sementes do mesmo lote.

## 5.2. Obtenção das Plantas

Sementes de feijão caupi cv. "Pitiúba" foram germinadas utilizando um sistema de rolo com papel do tipo germitest de dimensões de 28 x 28 cm, umedecidos com um volume de água deionizada equivalente a 2,5 vezes a massa do papel. A germinação foi realizada em uma câmara de crescimento, com temperaturas médias de  $27 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12 h, Radiação Fotossinteticamente Ativa (P.A.R.) de  $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na altura das plantas e umidade relativa do ar (UR) em torno de  $70 \pm 8\%$ . Quatro dias após a germinação, plântulas de tamanho similar foram transferidas para vasos de 0,9 L contendo solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) com  $\frac{1}{4}$  de força e mantidas em condições naturais de uma casa de vegetação: temperaturas médias de 34 °C durante o dia e 24 °C durante a noite, P.A.R. média de  $1200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  na altura das plantas, fotoperíodo médio de 12 h e UR média de 55%. O volume da solução nutritiva nos vasos era completado todos os dias, para evitar a dessecação de parte do sistema radicular. A composição da solução nutritiva utilizada está descrita na TABELA 3. No décimo primeiro dia após a transferência (estágio do primeiro trifolíolo completamente expandido), os tratamentos de estresse hídrico e estresse salino foram aplicados.

## 5.3. Coleta e Processamento do Material

Antes do procedimento de coleta, todos os folíolos foram superficialmente limpos com um pano suave e umedecido para a retirada de eventuais impurezas e dos restos da aplicação dos inibidores. Tal procedimento foi realizado com extremo cuidado para evitar danos ao material. Durante a coleta o material vegetal foi separado em duas partes: uma para as análises de conteúdo relativo de água e % de Umidade que foram realizadas com material fresco; e a outra parte foi submetida a congelamento rápido em nitrogênio líquido e armazenada em ultrafreezer a  $-80$  °C, para as análises de extração de proteínas, determinação de TBARS e de Ascorbato reduzido, conteúdo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e extração de RNA total.

## 5.4. Análises Estatísticas

Para os experimentos que se seguem, os dados foram analisados a partir de seus valores de média  $\pm$  desvio padrão e por análise de regressão linear. Quando necessário uma análise de variância (ANOVA) com desdobramentos para cada tratamento foi realizada. As diferenças significantes entre as médias foram analisadas pelo teste de Tukey, a 5% de



TABELA 3 – Composição da Solução Nutritiva utilizada. O pH final da solução utilizada foi ajustado para 6,0

Composto	Nomenclatura	Concentração Final	
		Solução Força Inteira	Solução ¼ de Força
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Nitrato de Cálcio	2,5 mM	625 µM
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de Amônio	1,0 mM	250 µM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de Potássio	500 µM	125 µM
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnésio	500 µM	125 µM
KNO <sub>3</sub>	Nitrato de Potássio	2,0 mM	500 µM
Fe-EDTA	Ferro – EDTA	100 µM	25 µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido Bórico	40,0 µM	10 µM
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	Cloreto de Manganês (oso)	9,0 µM	2,25 µM
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre (ico)	3,0 µM	750 ηM
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de Zinco	7,0 µM	1,75 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Molibidato de Sódio	0,1 µM	25 ηM

TABELA 4 – Potencial osmótico das diferentes soluções nutritivas contendo NaCl e PEG.

Tipo de Solução Nutritiva	Osmolalidade (mmol/kg)	Ψs (MPa)
Força Inteira (1X)	25	-0,06±0,01
¼ de Força (0,25X)	15	-0,04±0,01
¼ de Força + NaCl 50 mM	91	-0,22±0,02
¼ de Força + NaCl 100 mM	180	-0,43±0,02
¼ de Força + PEG 17,84%	190	-0,46±0,02

Os valores de osmolalidade foram obtidos utilizando um osmômetro de vapor de pressão Vapor 5520, Wescor, USA, segundo instruções do fabricante. Esses valores correspondem a uma média entre 4 mensurações provenientes de soluções preparadas independentemente. Os valores em MPa foram calculados a partir da relação  $1\text{mmol.kg}^{-1} = 2.408 \times 10^{-3} \text{ MPa}$  retirada de Santa-Cruz *et al.* (2002). Os valores em MPa correspondem às médias ± desvios padrões das 4 mensurações acima.

probabilidade ( $P < 0,05$ ). Ambos foram realizados com o auxílio do programa Sisvar (Versão 5.0; UFLA-DEX) (Ferreira, 2000).

### **5.5. Experimento I: Indicadores Fisiológicos de Estresse e Atividade de Enzimas Antioxidativas em Plantas de feijão caupi submetidas ao estresse hídrico causado por Polietilenoglicol (PEG-6000).**

#### *Hipótese*

Neste experimento inicial, foi testada a hipótese de que o declínio na taxa de fotossíntese e super-redução dos fotossistemas, devido ao fechamento estomático induzido por estresse hídrico, promove ativação de alguns dos sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos que estariam associados à resistência desta espécie a condições moderadas de estresse hídrico.

#### *Objetivo*

Verificar se o fechamento estomático induzido por estresse hídrico promove um aumento na atividade das enzimas antioxidantes e no conteúdo do antioxidante não-enzimático ascorbato (AsA), em tecidos foliares, relacionando-os com a resistência de plantas de feijão caupi ao estresse oxidativo.

#### *Desenho Experimental*

No 15º dia após semeadura (DAS) as plantas foram separadas em subexperimentos: um continuaria nas condições de casa de vegetação relatadas acima e o outro seria conduzido em uma câmara de crescimento com condições controladas ( $27 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12 h, P.A.R. média de  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na altura das plantas e UR média de  $70 \pm 8\%$ ). Tal procedimento foi realizado com o objetivo de comparar as respostas das plantas ao estresse hídrico em condições mais amenas de temperatura e luminosidade e as condições naturais do semi-árido nordestino. A solução nutritiva de todos os vasos foi então trocada e as plantas destinadas ao tratamento de estresse hídrico foram submetidas a uma dose fixa de 17,84% (p/v) de PEG, diluído na própria solução. Esta concentração foi escolhida por estar em condições aproximadamente iso-osmóticas com uma solução nutritiva contendo NaCl 100 mM, ou seja, um potencial osmótico de -0,45 MPa, considerado um estresse hídrico moderado para plantas de feijão caupi (TABELA 4). O experimento foi realizado entre os meses de Outubro e Novembro.

As coletas de material de ambos os subexperimentos foram realizadas em 0, 24, 48, 72, 96 horas após a aplicação do tratamento. Para separar efeitos fisiológicos devido à idade

das plantas, tratamentos controle, ausentes de PEG, foram também utilizados em cada tempo de coleta. O delineamento experimental de cada subexperimento foi do tipo inteiramente casualizado, com 2 tratamentos (controle e PEG 17,84%), 5 tempos (0, 24, 48, 72, 96 horas) e três repetições da parcela experimental, que consistia em um vaso com duas plantas.

### **5.6. Experimento II: Efeitos da aplicação do 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) no metabolismo oxidativo de plantas de feijão caupi submetidas ao estresse hídrico causado por PEG**

#### *Hipótese*

Para verificar uma possível ação coordenada entre os sistemas da catalase e da ascorbato peroxidase, plantas de feijão caupi submetidas a estresse hídrico foram tratadas com o 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) (FIGURA 9), um composto químico base para um conhecido herbicida, o amitrol. O 3-AT é um potente inibidor da enzima catalase (Havir, 1992), podendo ser aplicado nas folhas ou suplementado no meio de crescimento (Gechev *et al.*, 2005). Neste experimento, verifica-se a hipótese de que na ausência ou diminuição na atividade dos sistemas antioxidantes da CAT, sob condições de estresse ambiental, não existe compensação por parte da APX, aumentando o nível intracelular de AOS e consequentemente provocando danos oxidativos.

#### *Objetivo*

Elucidar a interação e a importância dos mecanismos enzimáticos de eliminação do  $H_2O_2$ , Catalase e Ascorbato Peroxidase, no metabolismo antioxidativo de plantas de feijão caupi sob condições de estresse hídrico induzidas por PEG, relacionando-as com os danos oxidativos apresentados.

#### *Desenho Experimental*

No 15º dia após semeadura (DAS) as plantas foram separadas em dois subexperimentos: um continuaria nas condições de casa de vegetação relatadas acima e o outro seria conduzido em uma câmara de crescimento com condições controladas ( $27 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 12 h, P.A.R. média de  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na altura das plantas e UR média de  $70 \pm 8\%$ ). Tal procedimento foi realizado com o objetivo de comparar as respostas das plantas ao estresse hídrico em condições mais amenas de temperatura e luminosidade e as condições naturais do semi-árido nordestino. A solução nutritiva de todos os vasos foi então trocada e as plantas destinadas ao tratamento de estresse hídrico foram submetidas a uma

dose fixa de 17,84% (p/v) de PEG, diluído na própria solução. Esta concentração foi escolhida por estar em condições aproximadamente iso-osmóticas com uma solução nutritiva contendo NaCl 100 mM, ou seja, um potencial osmótico de -0,45 MPa, considerado um estresse hídrico moderado para plantas de feijão caupi (TABELA 4). O experimento foi realizado no mês de Agosto.

As plantas foram submetidas a dois níveis de PEG (0 e 17,84%) e dois níveis de 3-AT (0 mM e 10 mM), em ambas as condições descritas acima. Uma solução de 3-AT (Sigma – Cód. A8056; FIGURA 3.1), preparada em uma solução aquosa contendo 0,01% Triton X-100, foi aplicada exogenamente na parte aérea, com o auxílio de um spray. Foram realizadas 4 aplicações diárias (9:00, 12:00, 15:00 e 18:00 h), totalizando aproximadamente 20 mg de 3-AT, por vaso, a cada dia (10 mg AT/planta/dia). A coleta do material vegetal foi realizada após o tratamento por 72 horas. O delineamento utilizado para cada subexperimento (Câmara de Crescimento e Casa de Vegetação) foi do tipo fatorial 2x2, com 2 tratamentos de PEG (0 e 17,84%), 2 tratamentos de 3-AT (0 mM e 10 mM), 1 tempo e 4 repetições da parcela experimental, que consistia em um vaso com duas plantas. Cada subexperimento foi realizado 2 vezes. Os tratamentos foram denominados: Controle; PEG, plantas submetidas a apenas o estresse hídrico induzido por PEG; PEG + AT, combinação do estresse hídrico aplicado na solução nutritiva, com a aplicação do inibidor 3'-AT nas folhas; AT, plantas apenas submetidas à aplicação exógena do inibidor na parte aérea.

### **5.7. Experimento III: Avaliação de indicadores fisiológicos de estresse e das respostas antioxidantes de plantas de feijão caupi submetidas ao estresse salino causado por NaCl e expostas ao 3-AT.**

#### *Hipótese*

As respostas antioxidativas do feijão caupi a condições de estresse hídrico e salino são comuns ou são estresse-específicas? Na tentativa de responder esta questão, plantas de feijão caupi foram submetidas à presença de NaCl na solução nutritiva de cultivo, em condições iso-osmóticas as das soluções contendo PEG 17,83%, e também foram expostas a aplicações diárias do inibidor de CAT, 3-AT. Este experimento também teve como foco a relação entre os sistemas antioxidantes enzimáticos da CAT e da APX.

#### *Objetivo*

Verificar se o comportamento e a interação entre os mecanismos enzimáticos de eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Catalase e Ascorbato Peroxidase, no metabolismo antioxidativo de plantas de feijão caupi submetidas ao estresse salino, são semelhantes aos apresentados por

estas plantas quando submetidas às condições de estresse hídrico induzido pela aplicação de PEG.

#### *Desenho Experimental*

No 15º dia após semeadura (DAS) plantas foram separadas em dois subexperimentos: um continuaria nas condições de casa de vegetação relatadas acima e o outro seria conduzido em uma câmara de crescimento com condições controladas ( $27\pm 2$  °C, fotoperíodo de 12 h, P.A.R. média de  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na altura das plantas e UR média de  $70\pm 8\%$ ). Tal procedimento foi realizado com o objetivo de comparar as respostas das plantas ao estresse hídrico em condições mais amenas de temperatura e luminosidade e as condições naturais do semi-árido nordestino. A solução nutritiva de todos os vasos foi então trocada e as plantas destinadas ao tratamento de estresse hídrico foram submetidas a uma dose fixa 100 mM de NaCl, diluído na própria solução. Esta concentração foi escolhida por estar em condições aproximadamente iso-osmóticas com uma solução nutritiva contendo PEG 17,84%, ou seja, um potencial osmótico de -0,45 MPa, considerado um estresse hídrico moderado para plantas de feijão caupi (TABELA 4). O experimento foi realizado nos meses de Outubro e Novembro.

As plantas foram submetidas a dois níveis de NaCl (0 e 100 mM) e dois níveis de 3-AT (0 mM e 10 mM), em ambas as condições descritas acima. Uma solução de 3-AT (Sigma – Cód. A8056; FIGURA 3.1), preparada em uma solução aquosa contendo 0,01% Triton X-100, foi aplicada exogenamente na parte aérea, com o auxílio de um spray. Foram realizadas 4 aplicações diárias (9:00, 12:00, 15:00 e 18:00 h), totalizando aproximadamente 20 mg de 3-AT, por vaso, a cada dia (10 mg AT/planta/dia). A coleta do material vegetal foi realizada após o tratamento por 72 horas. O delineamento utilizado para cada subexperimento (Câmara de Crescimento e Casa de Vegetação) foi do tipo fatorial 2x2, com 2 tratamentos de NaCl (0 e 100 mM), 2 tratamentos de 3-AT (0 mM e 10 mM), 1 tempo e 4 repetições da parcela experimental, que consistia em um vaso com duas plantas. Cada subexperimento foi realizado 2 vezes. Os tratamentos foram denominados: Controle; NaCl, plantas submetidas a apenas o estresse salino induzido por NaCl; NaCl + AT, combinação do estresse salino aplicado na solução nutritiva, com a aplicação do inibidor 3'-AT nas folhas; AT, plantas apenas submetidas a aplicação exógena do inibidor na parte aérea.

## 6. METODOLOGIA

### 6.1. Taxas de Transpiração e Condutância Estomática

As mensurações de transpiração e condutância estomática foram realizadas a partir do 15º DAS até 72 horas de tratamento, em ambas as plantas controle e submetidas ao estresse hídrico causado por PEG, realizadas todos os dias em um mesmo horário, as 10:00 h da manhã, utilizando um porômetro portátil Licor modelo 1600 (Licor – USA). As mensurações foram efetuadas em folhas fotossintéticas estabelecidas (um folíolo do primeiro trifolíolo) e estas foram marcadas para a realização das leituras nos dias subseqüentes. Os valores foram anotados após o tempo de estabilização do aparelho, cerca de 90 a 120 s.

### 6.2. Conteúdo Relativo de Água (C.R.A.)

A determinação do conteúdo relativo de água (C.R.A.) das folhas primárias foi realizada de modo análogo ao trabalho realizado por Cairo (1995). Foram retirados 20 discos de folhas primárias, de 12 mm de diâmetro, ao acaso, e determinada sua massa fresca ( $MF_1$ ) em balança analítica. Os discos foram então transferidos para uma placa de Petri contendo água destilada e colocados sobre a bancada do laboratório por um período de 12 horas sob iluminação constante (P.A.R. de aproximadamente  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Após esse período, os discos foliares foram removidos da placa de Petri, colocados em folha de papel de filtro e submetidos à leve pressão visando eliminar o excesso de água. Imediatamente, os discos foram pesados novamente e a massa aferida foi chamada de massa de tecido túrgido ou massa de tecido saturado ( $MF_2$ ). Em seguida, os discos foram colocados em sacos de papel e levados a uma estufa de ventilação forçada de ar, a  $75^\circ\text{C}$ , por um período de 48 horas, a fim de determinar-se a massa seca do tecido (MS). Os cálculos de CRA foram realizados por meio da seguinte relação:

$$\text{CRA}(\%) = \frac{MF_1 - MS}{MF_2 - MS} \times 100$$

### 6.3. Determinação do Percentual de Umidade (%Umidade)

A umidade no tecido foliar foi determinada segundo Slavik (1974) citado por Cavalcanti (2002), a partir da relação:

$$\%Umidade = \frac{MF_1 - MS}{MF_1} \times 100$$

As determinações de  $MF_1$  e  $MS$ , respectivamente massa fresca e massa seca, foram realizadas como descrito no item anterior.

#### **6.4. Determinação da Osmolalidade (Osm) e do Potencial Osmótico ( $\Psi_s$ ) dos Tecidos foliares**

Para as determinações da Osmolalidade dos tecidos foliares, 250 mg de massa fresca foram macerados com o auxílio de almofariz e pistilo, na presença de nitrogênio líquido. O macerado foi então transferido, antes de seu descongelamento, para uma seringa e comprimido contra uma malha fina de náilon. O exsudato foi então coletado com o auxílio de um pipetador automático, transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 10.000 x *g*, durante 10 minutos, à temperatura de 4 °C. Em seguida, uma alíquota de 10  $\mu$ L foi retirada e utilizada para a determinação da Osmolalidade em um osmômetro de vapor de pressão Wescor modelo 5520 (Wescor, USA) seguindo as instruções do fabricante. Os valores de osmolalidade ( $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) foram convertidos para potencial osmótico ( $\Psi_s$ ; -MPa), utilizando a relação:  $1\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1} = 2.408 \times 10^{-3} \text{MPa}$  (Santa-Cruz *et al.*, 2002).

#### **6.5. Concentração de $\text{Na}^+$ de tecidos foliares**

As concentrações de  $\text{Na}^+$  em tecidos foliares de feijão caupi foram determinadas conforme Viégas *et al.* (2001). Tecidos de folhas secos em estufa foram pulverizados, com auxílio de gral e pistilo, e armazenados em frascos fechados a temperatura ambiente. Amostras contendo 50 mg de farinha foram extraídas com 10 mL de água deionizada, em tubos hermeticamente fechados, em banho-maria a 100 °C durante 1 h. Após o resfriamento os extratos foram filtrados, em ponteiras com filtro de algodão, e realizadas leituras em fotômetro de chama (Micronal, modelo B462) calibrado com soluções padrão de NaCl, contendo 50 ppm de  $\text{Na}^+$ . Os conteúdos ( $\text{mmol} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ) de  $\text{Na}^+$  foram expressos na base de massa seca de folhas.

#### **6.6. Peroxidação de Lipídeos (TBARS)**

A peroxidação de lipídeos foi mensurada a partir da quantidade de malonilaldeído (MDA) do extrato de folhas, por meio de sua reação específica com o ácido tiobarbitúrico

(TBA), reação na qual é gerado um cromóforo de cor avermelhada. O método utilizado foi descrito inicialmente por Heath & Packer (1968) e adaptado por Peixoto (1999). 500 mg de material foliar fesco foram maceradas em almofariz, na presença de nitrogênio líquido, e a estes foram adicionados 1,5 mL da solução de TCA a 1 % (p/v). A mistura foi então transferida para microtubos de 2 mL e centrifugada a  $10.000 \times g$  por 15 minutos. O precipitado foi descartado. Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$ , do extrato bruto ou diluído foram transferidas para tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 2 mL de reagente contendo TBA a 0,5 % (p/v) dissolvido em TCA a 20 % (p/v). Os tubos foram selados e a mistura de reação foi mantida sob incubação em banho-maria a  $95\text{ }^\circ\text{C}$ , por 1 h, e em seguida resfriada em banho de gelo. Quando necessário, as amostras eram mais uma vez centrifugadas à temperatura ambiente ( $25\text{ }^\circ\text{C}$ ) por 10 minutos a  $2.000 \times g$ , em centrífuga de bancada. As leituras foram realizadas a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  nas absorvâncias de 532 e 660 nm, respectivamente (a última relativa à reação não específica). A segunda leitura foi subtraída da primeira para obtenção da leitura específica e a quantidade do complexo MDA-TBA formado foi calculada através do coeficiente de extinção molar de  $155\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  (Heath & Packer, 1968). Os resultados foram expressos em  $\eta\text{mol g}^{-1}\text{ MS}$  (Maia, 2004).

### 6.7. Determinação do Conteúdo de Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi determinada pelo método FOX descrito por Gay *et al.* (1999) e Gay & Gebicki (2000). Neste ensaio, o peróxido de hidrogênio reage com  $\text{Fe}^{+2}$  a pH baixo, na presença do corante alaranjado de xilenol (XO) para a formação de  $\text{Fe}^{+3}$ . A concentração de  $\text{Fe}^{+3}$  gerada é calculada pelo aumento da absorvância, ocasionado pela formação do complexo Fe-XO. A extração do  $\text{H}_2\text{O}_2$  de tecidos foliares foi realizada de acordo com as recomendações de Cheeseman *et al.* (2006).

Para isso, 250 mg de tecido fresco de folhas foram macerados na presença de nitrogênio líquido. Após a obtenção de farinha homogênea, 750  $\mu\text{L}$  de um tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,4 contendo KCN 5 mM, foram adicionados, seguido de maceração por mais 3 minutos. As amostras foram então centrifugadas a  $13.000 \times g$  por 20 minutos, a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Ao término, o sobrenadante foi coletado ( $\text{H}_2\text{O}_2$  total) e o precipitado, descartado. Em seguida, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  das amostras (diluídas, caso necessário) foram transferidas para tubos de ensaio e adicionadas da mistura de reação, que consistia em: 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$ , 100  $\mu\text{M}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 25 mM de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e 100  $\mu\text{M}$  de alaranjado de xilenol (Concentrações finais da reação). A mistura de reação foi incubada por 30 minutos, a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , e posteriormente, foram realizadas as leituras de absorvância, no comprimento de onda de



560 nm. As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram obtidas a partir de curva padrão e os dados foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ .

### **6.8. Determinação do Conteúdo de Ascorbato Reduzido**

As mensurações do conteúdo de Ascorbato reduzido (AsA<sub>Red</sub>) foram realizadas de acordo com Law *et al.*, (1983) e Córdoba-Pedregosa *et al.*, (2003). O procedimento de extração para esta determinação foi o mesmo utilizado no item 3.6. (Relação 1 massa de tecido: 3 volumes de TCA 1%). Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  foram retiradas e a elas adicionadas 12,5  $\mu\text{L}$  de NaOH 5M. A mistura foi então centrifugada a 3500 x g, por 2 minutos. O precipitado foi descartado e a uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 150 mM, pH 7,4 e 200  $\mu\text{L}$  de água destilada. As amostras foram então misturadas em Vórtex e deixadas à temperatura ambiente por 30 segundos. Em seguida, 400  $\mu\text{L}$  de TCA 10%, 400  $\mu\text{L}$  de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 44 % (v/v), 400  $\mu\text{L}$  de Bpiridil 4% em etanol 70% e 300  $\mu\text{L}$  de FeCl<sub>3</sub> foram, nesta ordem, adicionados. Os tubos foram misturados vigorosamente e incubados a 37 °C por 45 - 60 minutos. As amostras foram então lidas em um espectrofotômetro, no comprimento de onda de 525 nm. O conteúdo de AsA<sub>Red</sub> foi calculado a partir de curva padrão de ascorbato e os dados foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ .

### **6.9. Extração enzimática de tecidos foliares**

O processo de extração foi adaptado a partir do protocolo de Peixoto (1999). 500 mg de tecidos foliares frescos foram macerados em almofariz de porcelana, na presença de nitrogênio líquido, até obtenção de farinha homogênea. Em seguida, 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 contendo 1 mM de ácido L-ascórbico, 0,1 mM de EDTA foi adicionado, macerando as preparações por mais 90 s. Estas foram então centrifugadas a 13.000 x g, por 20 minutos, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante, considerado a fração de proteínas solúveis totais, foi coletado, filtrado, transferido para microtubos de 2 mL e armazenado à temperatura de -80 °C, para a determinação das atividades enzimáticas. A determinação da concentração de proteínas solúveis totais foi realizada por meio do método descrito por Bradford (1976) e expressos em mg Proteínas .  $\text{g}^{-1} \text{MS}$ .

### **6.10. Atividade total de Dismutases de Superóxidos (SOD; EC: 1.15.1.1)**

Esta atividade enzimática foi determinada segundo metodologia adaptada de Peixoto (1999) a partir de Del Longo *et al.* (1993) e Gianopolitis & Ries (1977). Por esse método, é determinada a inibição da redução do NBT (*p*-nitro blue tetrazolium) pelo extrato enzimático, evitando assim a formação do cromóforo. Neste ensaio, uma unidade de atividade enzimática (UA) de SOD é considerada como a quantidade de enzima necessária para obter 50 % de inibição da redução do NBT pela SOD contida no extrato enzimático.

Para tanto, os extratos foram descongelados em banho de gelo ( $\pm 4$  °C) e após liquefação, diluídos (conforme necessidade) no próprio tampão de extração. Alíquotas de 100  $\mu$ l foram então transferidas para tubos de ensaios protegidos da luz, contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, 0,1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 75  $\mu$ M de NBT. A reação foi iniciada pela adição de 2  $\mu$ M de Riboflavina e a concomitante transferência dos tubos para uma câmara iluminada por uma lâmpada fluorescente circular de 30 watts, durante um período de 6 minutos. Em seguida, leituras de absorbância a 560 nm foram tomadas em espectrofotômetro. Foram considerados como brancos da reação, os tubos sem extrato, expostos e não expostos à luz. A atividade foi determinada pelo cálculo da quantidade de extrato que inibiu 50 % da redução de NBT (Beauchamp & Fridovich, 1971) e expressa em UA . g<sup>-1</sup> MS . min<sup>-1</sup> e UA . mg<sup>-1</sup> Prot . min<sup>-1</sup> (Maia, 2004).

### **6.11. Atividade das Peroxidasas de Ascorbato (APX; EC: 1.11.1.1)**

A atividade de APX foi determinada de acordo com o método de Nakano & Asada (1981), modificado por Koshiba (1993), no qual a presença de APX no extrato bruto diminui a concentração de peróxido de hidrogênio do meio, pela redução de ácido ascórbico fornecido. Alíquotas de 100  $\mu$ L dos extratos diluídos (conforme necessidade) foram transferidas para tubos de ensaio. Ao meio de reação, 2,7 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,8 mM de ácido L-ascórbico P.A. foram adicionados. O experimento foi iniciado no momento da adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao meio de reação, observando o decréscimo da leitura no intervalo de 0 - 300 segundos (realizados a cada 30 segundos), da absorbância de 290 nm em espectrofotômetro. Adicionalmente, leituras de tubos controles, com e sem a amostra, na ausência de peróxido de hidrogênio, foram realizadas. Para efeito de cálculo, foi considerado o coeficiente de extinção molar do ascorbato, a 290 nm,  $\epsilon_{290} \text{AsA} = 2.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , calculado a partir de uma curva de concentração. As atividades do extrato total foram expressas em:  $\mu\text{Mol AsA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$  e em  $\eta\text{Mol AsA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Prot}$ .

### 6.12. Atividade de Catalases (CAT; EC: 1.11.1.6)

A atividade de catalases foi determinada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático a 2,9 mL de uma solução contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5 mM e tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, e pela medição da diminuição da absorvância a 240 nm, a 30°C (Havir & McHale, 1987). A atividade da enzima foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar calculado para estas condições, a partir de uma curva de concentração de 55,5  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  ( $\epsilon_{240}\text{H}_2\text{O}_2$ ). As atividades do extrato total foram expressas em:  $\mu\text{Mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  MS e em  $\eta\text{Mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  Prot.

### 6.13. Géis de atividade enzimática da Enzima Catalase (Zimograma de CAT)

Para a realização do gel de atividade enzimática da enzima CAT, alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  de cada repetição das amostras (Controle e Tratadas) de proteínas solúveis totais foram misturadas e diluídas 1:4 no tampão de Extração Enzimática (Tampão Fosfato de Potássio 100 mM contendo EDTA 0,1 mM, pH 7,0). A estas amostras foi então adicionada igual volume de tampão de amostra para eletroforese em condições nativas (Tris/HCl 0,5 M pH 6,8 adicionado de Glicerol e Azul de Bromofenol). Um sistema de dois géis foi utilizado nas seguintes condições: *Main gel* 7,5% e *Stacking gel* 5%. O sistema foi então embebido no tampão de corrida (Tris 0,025 M / Glicina 0,192 M, pH 8,3) e submetido as seguintes condições de corrida eletroforética: 250 V, 40 mA, 20 W.

Para visualização das isoformas de CAT, os géis foram incubados por 30 minutos em uma solução aquosa contendo 0,01% de Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Após a incubação, o excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi removido por sucessivas lavagens em água destilada. A seguir o gel foi incubado em uma solução de revelação ( $\text{FeCl}_3$  1% /  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  1%). As bandas acromáticas referentes à atividade de catalase foram rapidamente visualizadas em um fundo verde escuro (Scandalios, 1997).

### 6.14. Desenho do Peptídeo para reconhecimento das isoformas da enzima CAT

A estratégia para o desenho do peptídeo foi a identificação de uma região conservada de aminoácidos no alinhamento das seqüências primárias de catalases de Angiospermas disponíveis no *GenBank* (*National Institute for Biotechnology Information* – NCBI). O objetivo era, a partir de tal seqüência, produzir um peptídeo sintético, o qual pudesse induzir a produção de anticorpos capazes de reconhecer diferentes isoformas de catalase em V.

*unguiculata*. A partir do referido alinhamento de seqüências primárias de várias isoformas de catalase provenientes de espécies mono e dicotiledôneas, foi observada uma região conservada de 13 resíduos de aminoácidos:



Esta região obedecia às seguintes características:

- Apenas 3 aminoácidos hidrofóbicos: 2 resíduos de Fenilalanina (F) e 1 de Tirosina;
- A análise do peptídeo através do programa BLASTp (Altschul *et al.*, 1997), não revelou similaridade com outras seqüências primárias, bem como apresentou divergência com a estrutura primária de catalases de origem animal;
- A análise do perfil de antigenicidade através da ferramenta "Antigen Profiler" (<http://www.openbiosystems.com/antibodies>) indicou que este peptídeo apresentava excelentes características antigênicas.

O peptídeo foi sintetizado pela empresa Invitrogen numa escala de síntese de 5 mg e pureza de 70%, sendo gentilmente cedido pelo Dr. José Hélio Costa, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC.

### **6.15. Indução e Preparo dos Anticorpos**

Para a indução dos anticorpos, foi utilizado um coelho albino da raça Nova Zelândia com 4 meses de idade. 7 mg do peptídeo sintético de catalase foram dissolvidos em uma mistura de 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 e 1,5 mL de adjuvante completo de Freud (Sigma-Aldrich). A solução foi homogeneizada até que, uma emulsão não dispersante foi formada, quando uma gota da referida solução era colocada na superfície de uma solução salina. Esta emulsão foi dividida em duas partes iguais que foram aplicadas via intramuscular na região interna das coxas do coelho. Após 15 dias, uma outra injeção, nas mesmas condições foi aplicada, logo em seguida a uma coleta de sangue. Uma outra coleta sanguínea foi realizada após 2 semanas. A cada coleta, o sangue era incubado a temperatura de 37 °C por 30 minutos para coagulação. O soro era então separado do coágulo por uma centrifugação a 1000 x g, durante 20 minutos. A amostra de soro era então armazenada a -20 °C.

### **6.16. Imunoblot de Proteínas (*Western Blot*)**

A transferência eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose foi feita de acordo com o método descrito por Marcellino & Grossi de Sá (1998), com algumas modificações. Uma eletrotransferência do tipo molhada foi realizada, utilizando o tampão Tris 25 mM / Glicina 192 mM, Metanol 20%, SDS 0,01%, pH 8,3, em uma unidade de transferência TE 22 *Tank Transfer Unit* (*Amersham Biosciences*). Após a transferência, a membrana de nitrocelulose (Hybond™ – ECL™ – *Amersham Biosciences*), foi mergulhada em uma solução de Ponceau S, para corar as proteínas que se ligaram efetivamente à membrana. Esta solução foi preparada (Diluição 1:10) a partir de uma solução estoque com a seguinte composição: 2 g de Ponceau S Sal dissódico, 30 g de ácido tricloroacético, 30 g de ácido sulfossalicílico em um volume final de 100 mL de água destilada.

Após a identificação das posições referentes às bandas do marcador de peso molecular, os sítios de ligação para as imunoglobulinas na membrana de nitrocelulose foram bloqueados, por meio de uma solução de leite em pó desnatado a 10% (p/v) preparada em um tampão fosfato-salino (PBS: tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo NaCl 140 mM e KCl 2,7 mM), durante 4 a 6 horas. Em seguida a membrana foi incubada com a solução do anticorpo diluída 1:500, preparada na solução de bloqueio 5% (p/v), durante 2 h, a temperatura ambiente. Após 5 lavagens sucessivas de 5 minutos, com 50 mL de tampão PBS, a membrana foi incubada por 2 h, sob agitação lenta, com o anticorpo secundário (IgG) conjugado com a enzima fosfatase alcalina, diluído 1:5000, também preparado na solução de bloqueio. Após uma nova série de lavagens com tampão PBS, a membrana foi submetida à solução de detecção contendo o composto 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT-Sigma – Cód. B5655). Este substrato é convertido pela fosfatase alcalina num composto de cor púrpura. A membrana foi deixada nesta solução sob agitação lenta, até que as bandas referentes à CAT alcançassem a intensidade desejada (cerca de 30 a 60 minutos). A reação foi parada com a retirada da solução BCIP/NBT e adição de água destilada.

### **6.17. Desenho dos Iniciadores específicos para as enzimas CAT e cAPX.**

Iniciadores específicos para os genes das enzimas cAPX e CAT foram desenhados com o objetivo de se estudar a expressão de seus respectivos mRNAs pela técnica de PCR Quantitativo, tomando como base seqüências de genes que codificam para estas enzimas de espécies de mono e dicotiledôneas já depositadas no *GenBank* (NCBI – *National Center*

*Biotechnology Information*; www.ncbi.nlm.nih.gov). Para o gene da enzima cAPX de *Vigna unguiculata*, os iniciadores específicos foram desenhados a partir da seqüência de mRNA, depositada no referido banco, sob o número de acesso U61379, previamente caracterizada em um estudo realizado por D'arcy-Lameta *et al.* (2006).

A obtenção de iniciadores degenerados para o gene da enzima CAT foi realizada a partir da identificação de regiões conservadas no alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos presentes no *GenBank*, com o auxílio do programa ClustalX, versão 1.83 (Thompson *et al.*, 1997). A especificidade dos iniciadores obtidos foi estimada a partir de uma busca de similaridade no *GenBank*, por meio do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1997). O gene de expressão constitutiva *ef1 $\alpha$* , que codifica para o fator de alongamento 1- $\alpha$ , foi o escolhido para a normalização dos níveis de expressão dos mRNAs de interesse. A opção por este gene foi baseada no estudo de Nicot *et al.* (2005). Todos os iniciadores foram encomendados junto à empresa Invitrogen e suas respectivas seqüências estão relatadas na TABELA 5.

#### **6.18. Extração de RNA Total de tecidos foliares de feijão caupi**

As extrações de RNA total foram realizadas com o reagente Concert<sup>®</sup> Plant RNA (Invitrogen Inc.). Esse reagente fornece amostras de RNA total, com extrema pureza, livres de interferentes como compostos fenólicos e carboidratos, ideal para reações de RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction*). Para isso 100 mg de material foliar fresco foram macerados em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo e a adicionados a tubos de microcentrífuga contendo 0,5 mL do referido reagente. Os tubos foram homogeneizados e deixados deitados a temperatura ambiente por 5 minutos e em seguida, centrifugados a 12.000 x g por 2 minutos. Ao sobrenadante foram então adicionados 0,1 mL de NaCl 5M e 0,3 mL de clorofórmio. Após uma nova centrifugação a 12.000 x g, por 10 minutos, a 4 °C, a fase aquosa (fase superior) foi transferida para um novo tubo, precipitada com um volume igual de isopropanol e deixada em repouso por 10 minutos. Após uma nova centrifugação (12.000 x g, por 10 minutos, a 4 °C) o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 75%. O precipitado foi então

TABELA 5 – Descrição dos iniciadores utilizados para as reações de RT-PCR Quantitativo.

<b>Iniciador</b>	<b>Seqüência 5'-3'</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Tamanho do Amplificado (pb)</b>
<i>Catalase*</i>			
rtCAT F	CACAAYAAYCAYYAYGADGG	56	
rtCAT R	GGGAAGTAATYVACCTCYTC	53	120
<i>Ascorbato Peroxidase citossólica</i>			
rtcAPX F	AAATCTTACCCAACCGTCAGCG		
rtcAPX R	CAAACGGAGCATCAAAGGAG	61	65
<i>Fator de alongamento 1-<math>\alpha</math></i>			
ef1a F	ATTGGAAACGGATATGCTCCA	79	
ef1a R	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA	79	101

\* Seqüências cedidas pelo Dr. José Hélio Costa, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC.

TABELA 6 – Condições térmicas utilizadas nas Reações de RT-PCR Quantitativo, para os mRNAs das enzimas Catalase e Ascorbato Peroxidase.

<b>Gene</b>	<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>
<i>APX</i>			
	Desnaturação Inicial	95	00:10:00
	Desnaturação	95	00:00:15
	Anelamento	55	00:00:30
	Extensão	60	00:00:30
	No. De Ciclos: 50		
<i>CAT</i>			
	Desnaturação Inicial	95	00:10:00
	Desnaturação	95	00:00:15
	Anelamento	52	00:01:00
	Extensão	60	00:00:30
	No. De Ciclos: 50		

dissolvido em um volume de 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato, inibidor de RNAses).

### **6.19. Eletroforese de RNA em condições não-desnaturantes**

Para verificar a integridade e qualidade do RNA extraído, uma eletroforese em gel de agarose a 1% em condições não-desnaturantes foi realizada. Neste tipo de eletroforese, é observada a presença dos RNA ribossômicos 26S e 18S, além de alguns RNA mensageiros de maior tamanho. Pela observação das bandas correspondentes a estes rRNAs se tem uma idéia da qualidade do RNA extraído. No entanto, vale ressaltar que essa verificação é apenas qualitativa, com o único objetivo de avaliar a extração realizada.

As eletroforeses de RNA em gel de agarose foram realizadas segundo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Resumidamente, a quantidade de agarose 0,5 g foi adicionada a 50 mL de tampão TBE (Tris-Ácido Bórico 0,045 M, EDTA 0,001 M). Após ser completamente fundida, a mistura foi resfriada a 50 °C e o brometo de etídio adicionado, a partir de uma solução estoque de 10 mg/mL, em água, de maneira que sua concentração final seja de 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O gel permaneceu em repouso à temperatura ambiente até a sua completa solidificação (15 a 20 minutos).

As amostras submetidas à corrida eletroforética foram previamente diluídas em uma solução de azul de bromofenol 0,25% (m/v), glicerol 30% (v/v), preparada em tampão TE (Tris-HCl 1 M / EDTA 0,5 M, pH 8,0), nas concentrações anteriormente citadas. O gel foi submerso em tampão TBE, com o brometo de etídio na concentração final anteriormente citada. As amostras foram então aplicadas ao gel e a corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100V. A corrida foi encerrada quando o azul de bromofenol visualizado percorreu mais de 2/3 do comprimento do gel. O gel foi visualizado em um transluminador de raios ultravioleta – UV e o RNA observado pela fluorescência do brometo de etídio quando exposto aos raios UV.

### **6.20. Síntese da primeira fita de cDNA**

Para a síntese da primeira fita de cDNA total, uma alíquota das amostras de RNA total, contendo aproximadamente 10  $\mu\text{g}$  foram transferidas para microtubos de 200  $\mu\text{L}$ . A estas foi adicionado o tampão RT 1x (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; KCl 75 mM;  $\text{MgCl}_2$  3 mM e DTT 10 mM – fornecido junto com a transcriptase reversa de MMLV), 10 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10  $\mu\text{M}$  dos iniciadores não específicos Oligo-deoxirribonucleotídeo T (Oligo-dT, 18 mer.). Os tubos foram então incubados em banho-



maria a 70 °C por 5 minutos e transferidos para o gelo. Em seguida, foram adicionadas 200 Unidades da enzima transcriptase reversa MMLV (MMLV-RT), e os tubos foram colocados em um *termomixer* (Eppendorf) à temperatura de 37 °C durante 30 minutos, para a realização da síntese de cDNA (Baier *et al.*, 2000). As amostras de cDNA foram colocadas em um banho-maria a 75 °C, para inativação da MMLV-RT e armazenadas a -80 °C. A visualização da eficiência da reação foi realizada por meio de uma eletroforese em gel de agarose, como descrito no item 3.18.

Para estimar a concentração das amostras de cDNA, uma alíquota do extrato total foi diluída em tampão TE, e mensurada a sua absorbância a 260 nm. O cálculo utilizado para estimar a concentração de RNA foi o seguinte:

$$[\text{RNA}] = 40 \mu\text{g/mL} \times \text{Fator de Diluição} \times \text{Leitura da Absorbância a } 260 \text{ nm}$$

$$[\text{cDNA}] = 50 \mu\text{g/mL} \times \text{Fator de Diluição} \times \text{Leitura da Absorbância a } 260 \text{ nm}$$

De acordo com o descrito por (Sambrook *et al.*, 1989; Romano, 1998).

### 6.21. Análise da Expressão dos mRNAs por RT-PCR Quantitativo

As análises de expressão foram realizadas por meio da técnica de Reação em Cadeia da DNA Polimerase Quantitativa, também conhecida como PCR em tempo real. A detecção foi baseada na tecnologia do corante *SYBR Green I*. Este corante tem uma alta especificidade por DNA de fita dupla permitindo a determinação quantitativa do número de cópias de um determinado cDNA molde. Sua aplicação tem sido amplamente aceita para estudos de RT-PCR quantitativo (Gachon *et al.*, 2004; Zipper *et al.*, 2004). As reações foram realizadas em um aparelho *Mastercycler ep Realplex* (Eppendorf, Hamburg) utilizando o kit *Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)*, de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações ótimas para cada par dos iniciadores, obtidas em uma série de reações testes, foram as seguintes: 900 nM para ambos iniciadores da CAT; 300 nM para o cAPXF (5') e 900 nM cAPXR (3'); e 300 nM para ambos os iniciadores do gene *ef1α*. As condições térmicas das reações de RT-PCR Quantitativo estão relatadas na TABELA 6. No final de cada reação, uma curva de *melting* foi obtida para se ter uma estimativa da ocorrência de amplificação de fragmentos não-específicos. As análises dos níveis de expressão dos mRNAs que codificam para as enzimas CAT e cAPX, relativos à expressão do gene constitutivo *ef1α* foram baseadas no método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , descrito por Livak & Schmittgen (2001).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Experimento I: Indicadores Fisiológicos de Estresse e Atividade de Enzimas Antioxidativas em Plantas de feijão caupi submetidas ao estresse hídrico causado por PEG.

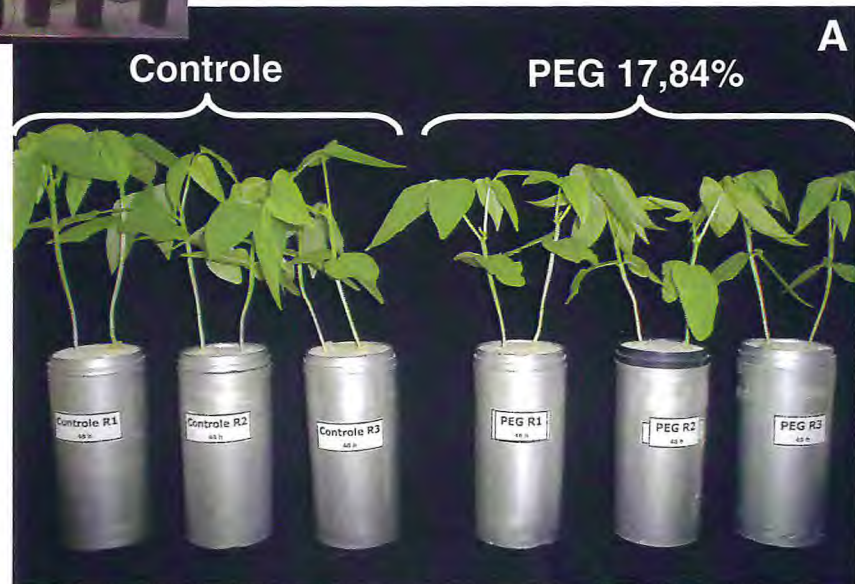
Para analisar se as alterações nos parâmetros fisiológicos induziram mudanças nas respostas antioxidativas nas folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp., plantas da cultivar "Pitiúba" foram expostas ao estresse hídrico induzido pela aplicação de PEG na solução nutritiva, em diferentes tempos. Para se verificar a influência do ambiente sobre estas respostas, as plantas foram ainda submetidas a duas diferentes condições: em uma câmara de crescimento sob condições controladas de temperatura e luminosidade; e em condições de casa de vegetação, simulando as condições ambientais do semi-árido nordestino. No momento da aplicação dos tratamentos, todas as plantas, em ambas as condições, estavam no mesmo estágio fisiológico, com o 1º trifolíolo completamente expandido, e o 2º em fase inicial de expansão.

O estresse osmótico causado pela aplicação do PEG induziu uma acentuada redução no crescimento das plantas de feijão caupi, em ambas as condições testadas. No entanto, na câmara de crescimento tal redução só era evidenciada a partir de 48 h de tratamento (FIGURA 10A) enquanto que, nas condições de casa de vegetação, a diferença no crescimento entre plantas tratadas e não-tratadas já era observada a partir de 24 h, estando bem evidente em 48 h (FIGURA 10B). As principais diferenças no crescimento foram observadas no alongamento do caule e na expansão do 2º trifolíolo, que praticamente cessava. Nas raízes das plantas tratadas com PEG, em ambas as condições, observava-se uma diminuição na expansão lateral, ou seja, nas raízes secundárias e um intenso alongamento da raiz principal.

As plantas tratadas submetidas às condições de casa de vegetação apresentaram uma redução abrupta na taxa de transpiração, logo após 24 h de aplicação do tratamento, permanecendo constante durante o restante do período experimental. Esta redução foi acompanhada por um significativo aumento na resistência estomática (FIGURA 11). As plantas não-tratadas apresentaram maiores valores de transpiração durante todo o período experimental, e este valor foi significativamente acrescido ( $P < 0,05$ ) em 48 h e 72 h, provavelmente devido a uma maior expansão foliar. Estas plantas também apresentaram uma pequena resistência estomática, que não apresentou variação significativa durante todo o experimento (FIGURA 11).



### Câmara de Crescimento



### Casa de Vegetação

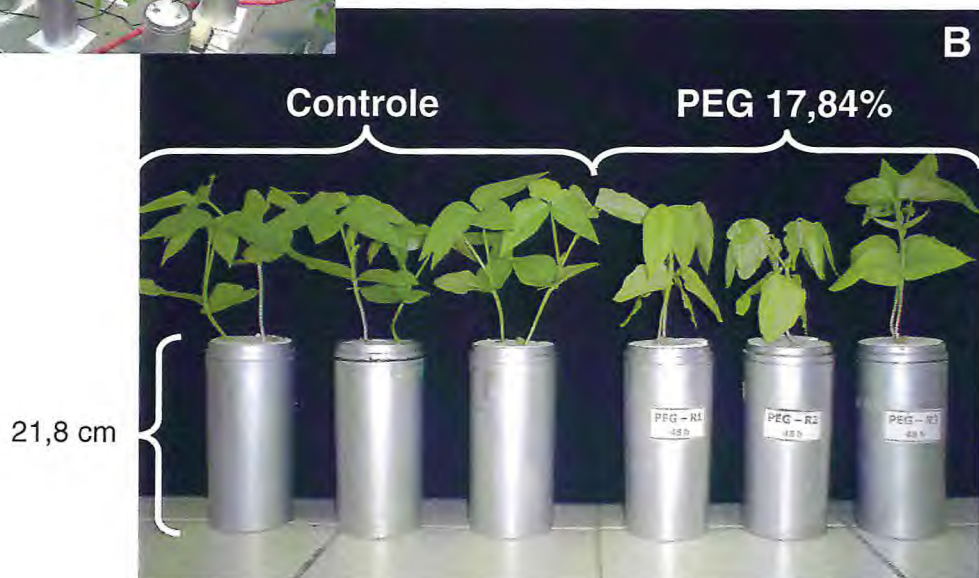


FIGURA 10 – Aspecto Visual das plantas de *Vigna unguiculata* cv. "Pitiúba", 48 h após a aplicação do tratamento de estresse. (A) Plantas mantidas em condições controladas de câmara de crescimento; (B) Plantas mantidas nas condições de casa de vegetação.

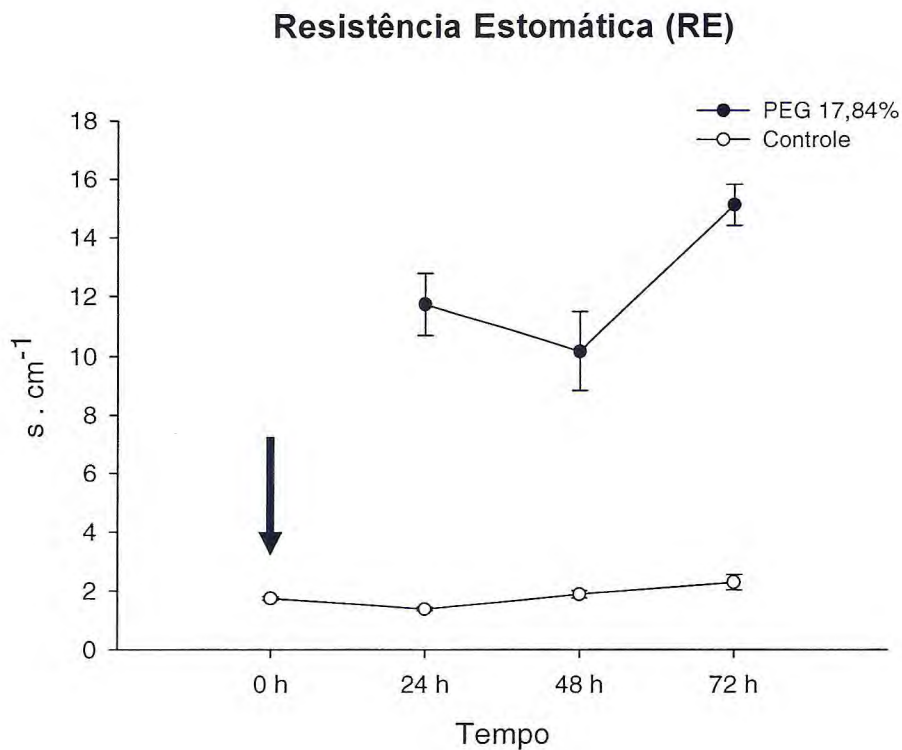
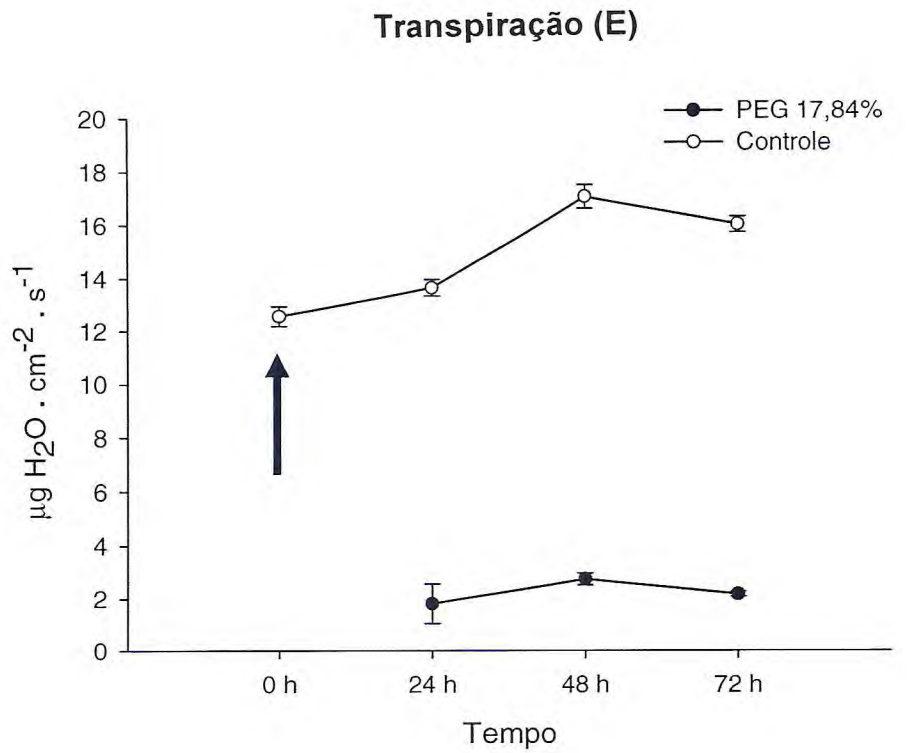


FIGURA 11 – Taxas de transpiração e Resistência Estomática (RE) das plantas Controle (O) e submetidas a estresse hídrico induzido por PEG (●), nas condições de casa de vegetação. As setas indicam o momento da aplicação dos tratamentos. Os dados representam médias  $\pm$ desvio padrão de 4 plantas.

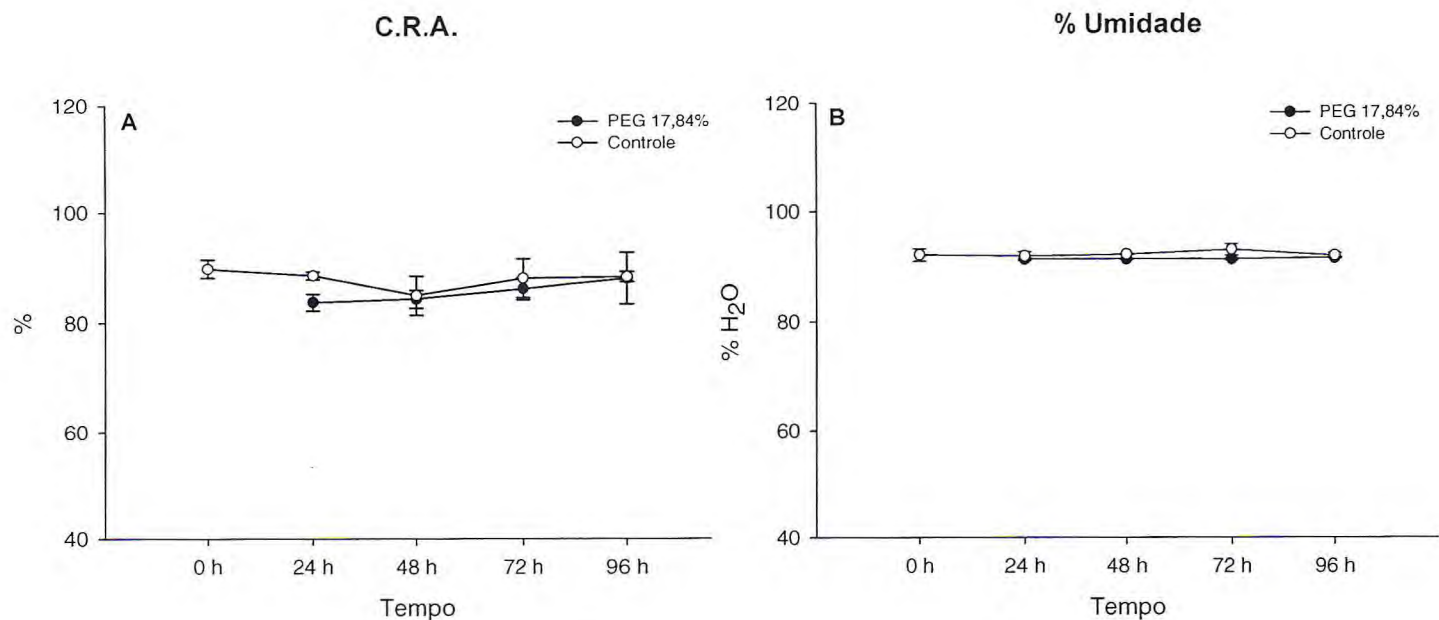
Para avaliar o efeito do estresse hídrico nas plantas de feijão caupi, o conteúdo relativo de água (C.R.A.) foi determinado. Observou-se uma diminuição significativa neste valor ( $P < 0,05$ ) nas plantas tratadas com PEG sob condições controladas, no tempo de 24 h. No entanto, a partir de 48 h, os valores de C.R.A. destas plantas se apresentaram similares aos das plantas controle (FIGURA 12A). Nas condições de casa de vegetação, tanto as plantas tratadas como as não-tratadas apresentaram menores valores de C.R.A. se comparados com as plantas conduzidas na câmara de crescimento, e nenhuma diferença foi evidenciada entre ambos tratamentos (FIGURA 12C). O percentual de umidade não apresentou variação em nenhuma das condições testadas (FIGURA 12B e D).

Os valores mensurados de Potencial Osmótico ( $\Psi_s$ ) das plantas tratadas com PEG apresentaram reduções significativas e lineares com o tempo, quando comparados aos das plantas controle, em ambas as condições de cultivo (FIGURA 13A e B). No entanto, o ambiente influenciou significativamente os valores de ( $\Psi_s$ ) das plantas submetidas ao estresse osmótico. Nas condições controladas de câmara de crescimento, as plantas tratadas apresentaram valores entre -0,74 MPa (24 h) e -0,93 MPa (96 h), enquanto que, nas condições de casa de vegetação, estes valores variaram entre -1,04 MPa (24 h) e -1,94 (96h). Nenhuma variação significativa ou efeito do ambiente foi observado nos valores das plantas controle (FIGURA 13A e B).

Diferenças significativas também foram observadas na peroxidação de lipídeos dos tecidos foliares de plantas de feijão caupi, em ambos os ambientes de cultivo, evidenciado pelo indicador de TBARS (FIGURA 14A e C). As plantas tratadas com PEG apresentaram um maior teor de peroxidação de lipídeos durante todo o período experimental. Nestas plantas, em ambiente controlado, um pico no valor do TBARS foi observado em 72 h, permanecendo até o tempo de 96 h. Nas plantas tratadas com PEG na casa de vegetação, dois picos nos valores do indicador de TBARS foram observados: um 48 h após o tratamento, permanecendo até 72 h, e outro com 96 h. Apesar de nenhuma influência do ambiente ter sido observada nas plantas controle, este influenciou os valores de TBARS das plantas tratadas com PEG de forma significativa ( $P < 0,05$ ).

O tratamento de PEG induziu um incremento no conteúdo de Ascorbato Reduzido ( $AsA_{Red.}$ ) em ambas as condições de cultivo (FIGURA 14B e D). Nas condições de câmara de crescimento, um pico no teor deste antioxidante foi observado no tempo de 72 h, enquanto que nas condições de casa de vegetação houve um aumento linear com o tempo, de 24 h a 96 h. Nas plantas não-tratadas, o conteúdo de  $AsA_{Red.}$  apresentou um leve aumento entre 24 h e 48 h, em ambos os ambientes estudados. Neste caso, não houve influência do ambiente.

## Câmara de Crescimento



## Casa de Vegetação

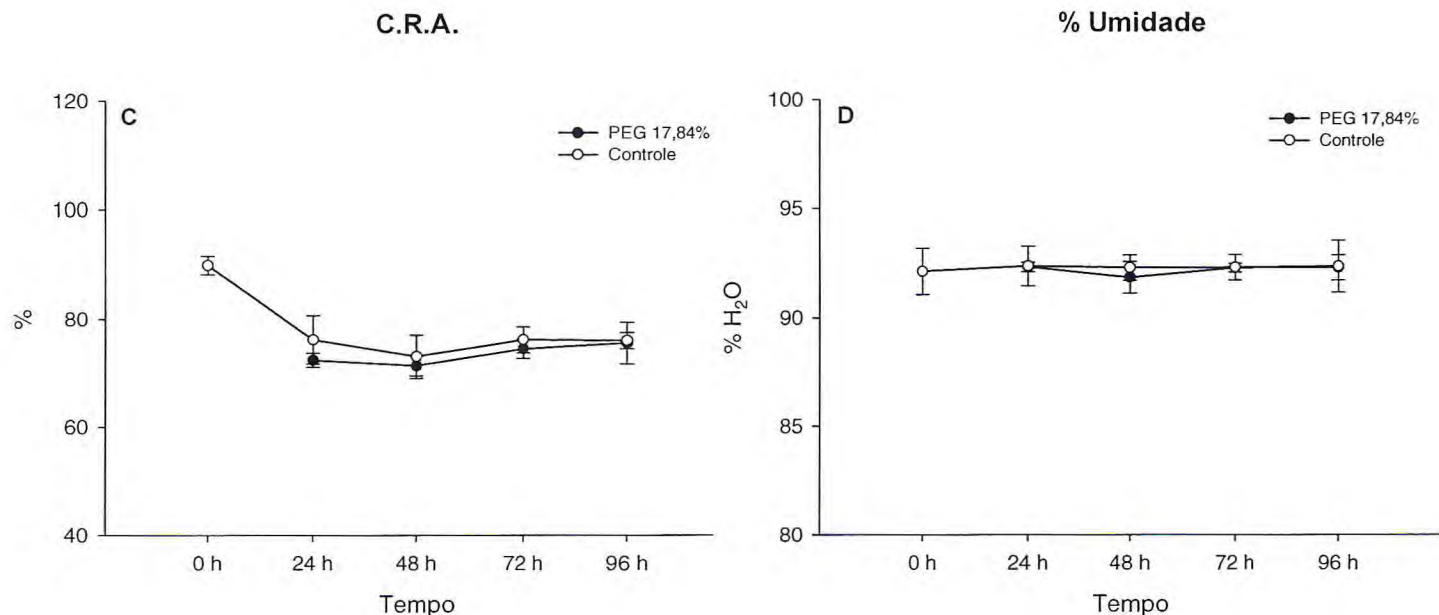
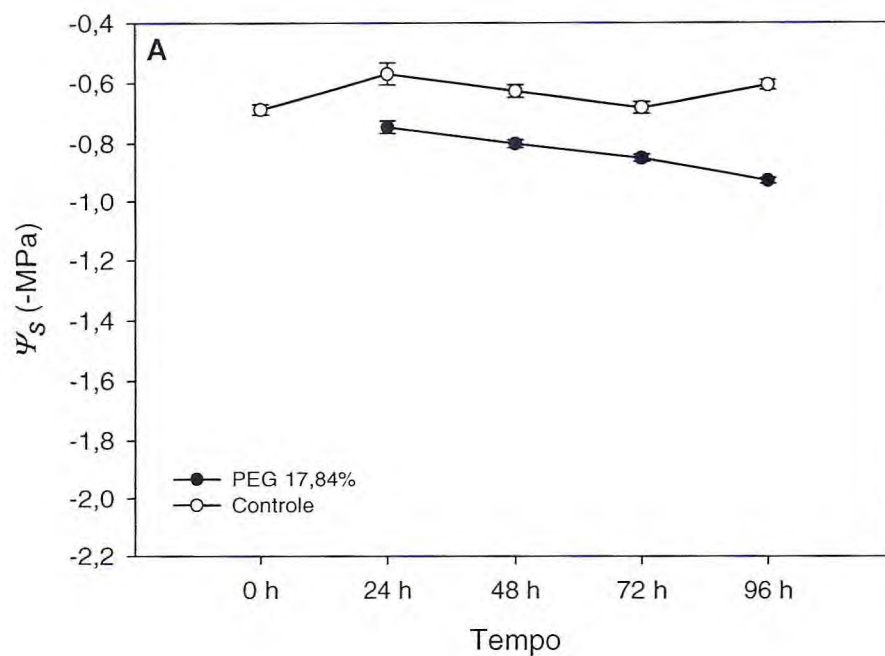


FIGURA 12 – (A), (C) Conteúdo Relativo de Água (CRA) e (B), (D) % Umidade das plantas, em condições controladas de câmara de crescimento e em condições de casa de vegetação, respectivamente. (O) representa as plantas Controle e (●) as submetidas a estresse hídrico induzido por PEG. Os dados representam médias  $\pm$  desvio padrão de 3 plantas.

### Potencial Osmótico - Câmara de Crescimento



### Potencial Osmótico - Casa de Vegetação

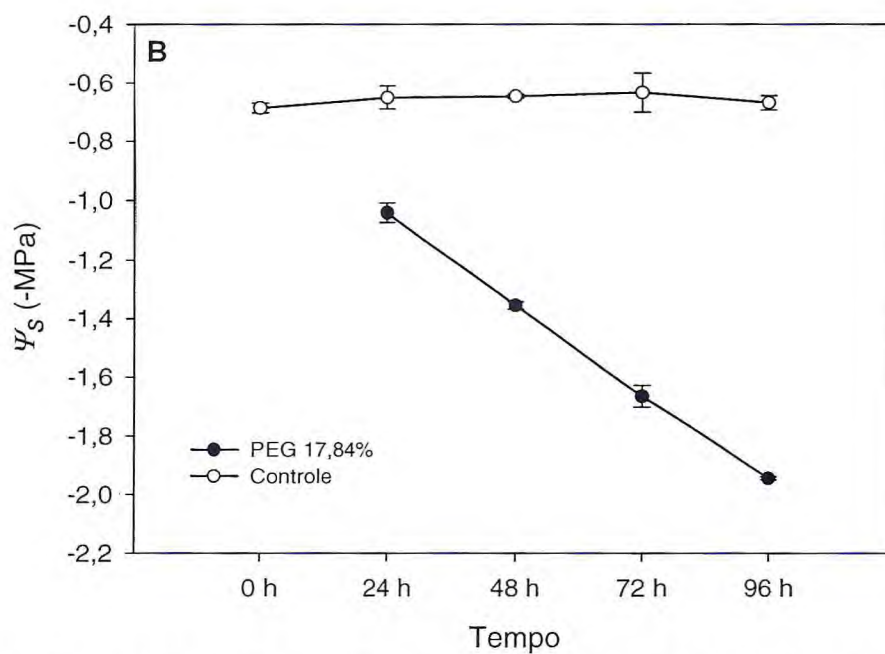
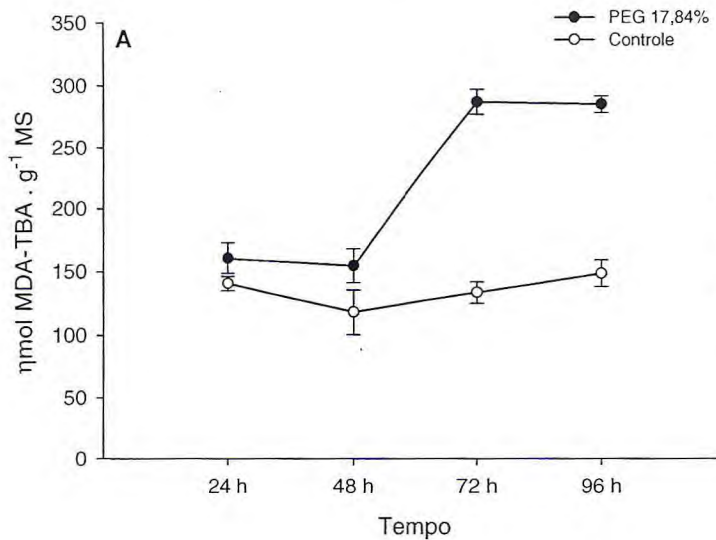


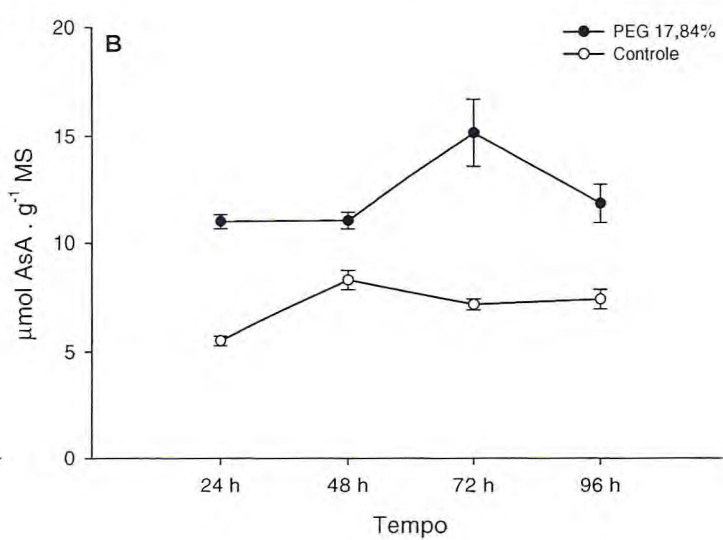
FIGURA 13 – Potencial Osmótico das plantas Controle (O) e submetidas a estresse hídrico induzido por PEG (●), em: (A) condições controladas de câmara de crescimento; e (B) em condições de casa de vegetação. Os dados representam médias  $\pm$ desvio padrão de 3 plantas.

## Câmara de Crescimento

### Peroxidação de Lipídeos (TBARS)

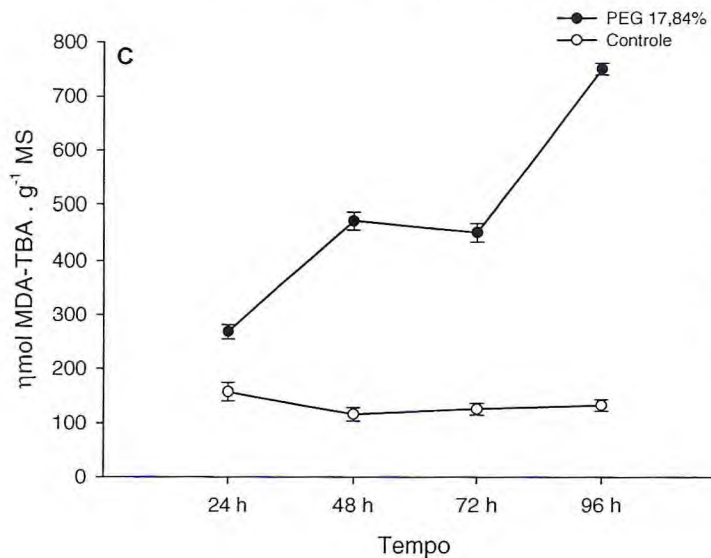


### AsA<sub>Red.</sub>



## Casa de Vegetação

### Peroxidação de Lipídeos (TBARS)



### AsA<sub>Red.</sub>

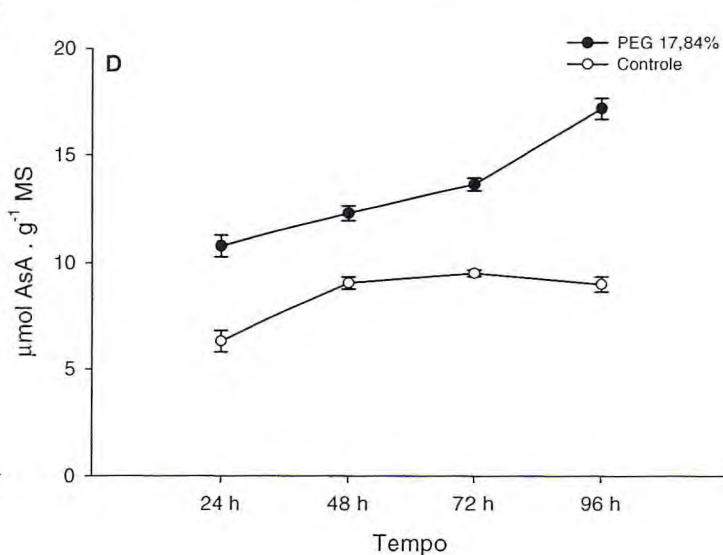


FIGURA 14 – (A), (C) Peroxidação de Lipídeos (TBARS) e (B), (D) Conteúdo de Ascorbato Reduzido (AsA<sub>Red.</sub>), em condições controladas de câmara de crescimento e em condições de casa de vegetação, respectivamente. (O) representa as plantas Controle e (●) as submetidas a estresse hídrico induzido por PEG. Os dados representam médias  $\pm$  desvio padrão de 3 plantas.

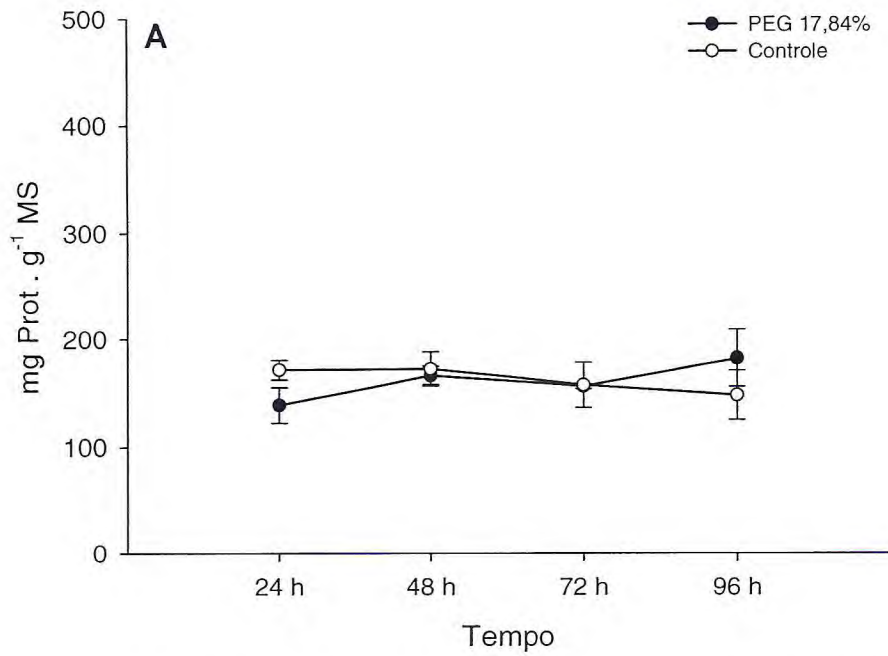


Para verificar a resposta do sistema antioxidante enzimático, de folhas de feijão caupi, as atividades de SOD, APX e CAT foram mensuradas. A enzima SOD apresentou uma atividade contrastante entre os dois ambientes testados. Em condições controladas de câmara de crescimento, foram observados maiores valores de atividade desta enzima nas amostras tratadas com PEG, com pequena variação no decorrer do tempo (FIGURA 16A e B). Nas condições de casa de vegetação, embora as plantas tratadas tenham apresentado maiores valores de atividade de SOD na base de massa seca (FIGURA 16C), este aumento foi provavelmente devido a uma maior concentração de proteínas solúveis nestes extratos (FIGURA 15B). Portanto a atividade específica desta enzima nestas condições apresentou uma diminuição se comparada aos valores obtidos pelas plantas não-tratadas (FIGURA 16D).

Outra enzima que também apresentou resultados contrastantes entre os dois ambientes estudados foi a APX. Nas condições de câmara de crescimento, as plantas submetidas ao estresse osmótico apresentaram uma crescente diminuição da atividade desta enzima, aproximando-se dos valores do controle, apenas no tempo de 72 h (FIGURA 17A e B). Este aumento parece estar fisiologicamente associado com o incremento observado no conteúdo de  $AsA_{Red}$  também no tempo de 72 h (FIGURA 14C). Nas condições de casa de vegetação, a atividade de APX das plantas tratadas foi menor do que a das plantas controle no tempo de 24 h, entretanto apresentaram maiores valores a partir do tempo de 48 h, até o fim do período experimental (FIGURA 17D).

Os níveis de atividade da enzima CAT foram menores nas plantas tratadas, independentemente do ambiente estudado. No entanto, enquanto que nas condições controladas a queda na atividade desta enzima no tratamento de PEG foi observada a partir de 24 h (FIGURA 18A e B), nas condições da casa de vegetação, esta queda em relação ao controle só foi observada a partir de 48 h da aplicação dos tratamentos (FIGURA 18D). Variações na atividade desta enzima nas plantas não-tratadas também foram evidenciadas. É interessante observar que o fator ambiente exerceu influência significativa nos níveis de atividade de todas as enzimas estudadas (FIGURA 16, 17 e 18).

### Proteínas Solúveis Totais - Câmara de Crescimento



### Proteínas Solúveis Totais - Casa de Vegetação

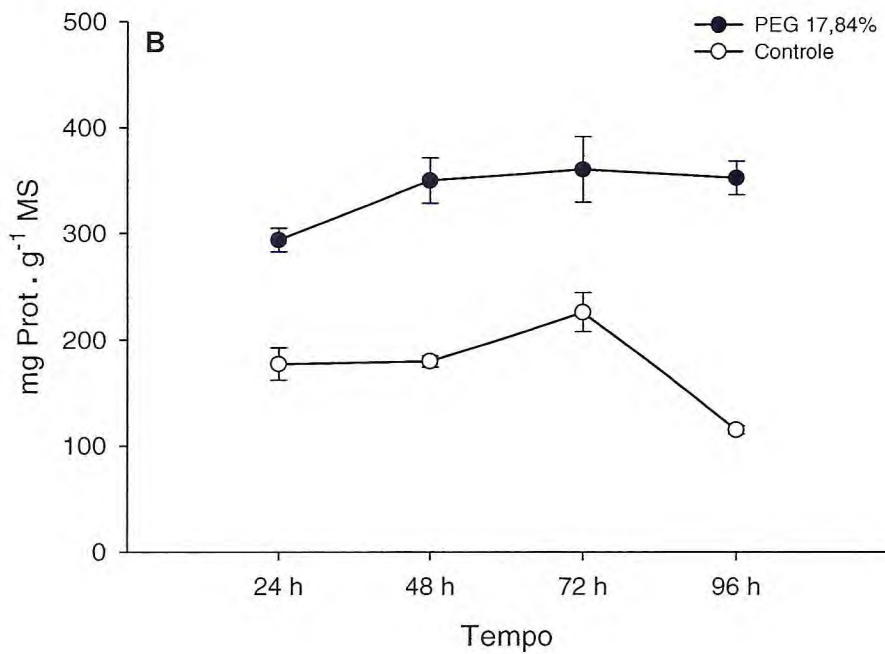
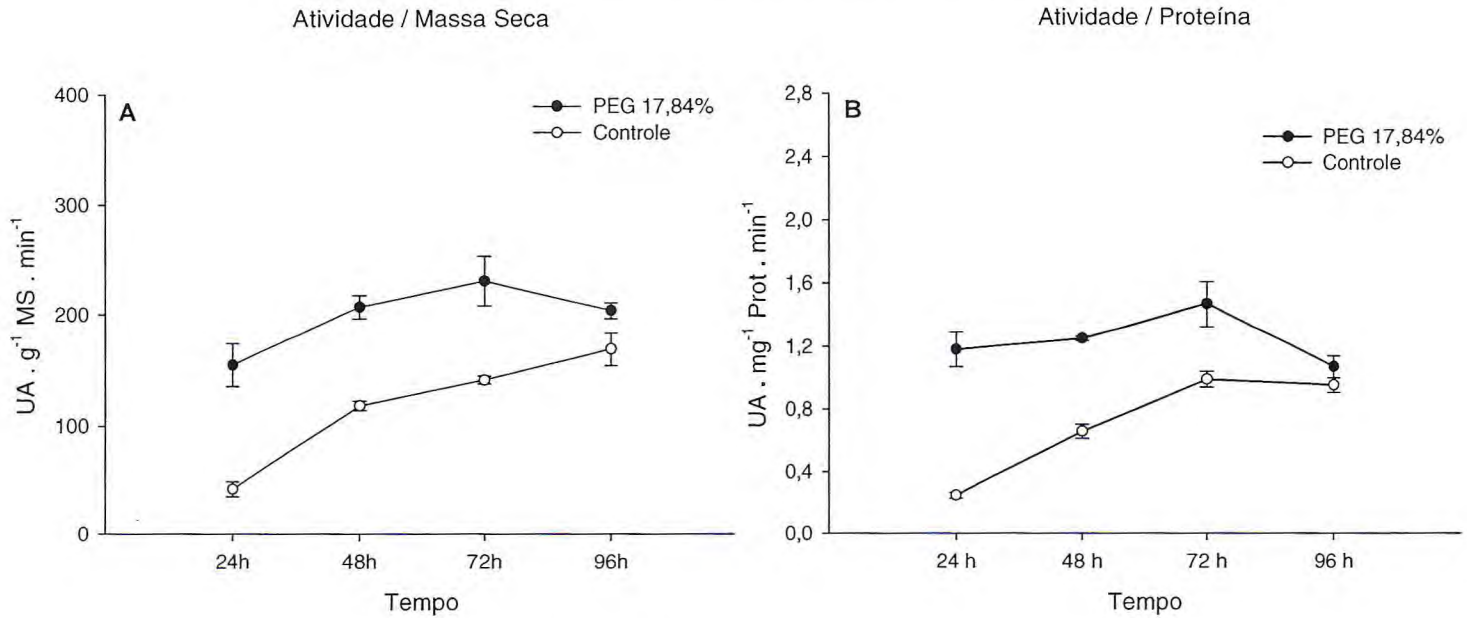


FIGURA 15 – Proteínas Solúveis Totais das plantas Controle (O) e submetidas a estresse hídrico induzido por PEG (●), em: (A) condições controladas de câmara de crescimento; e (B) em condições de casa de vegetação. Os dados representam médias  $\pm$  desvio padrão de 3 plantas.

## SOD - Câmara de Crescimento



## SOD - Casa de Vegetação

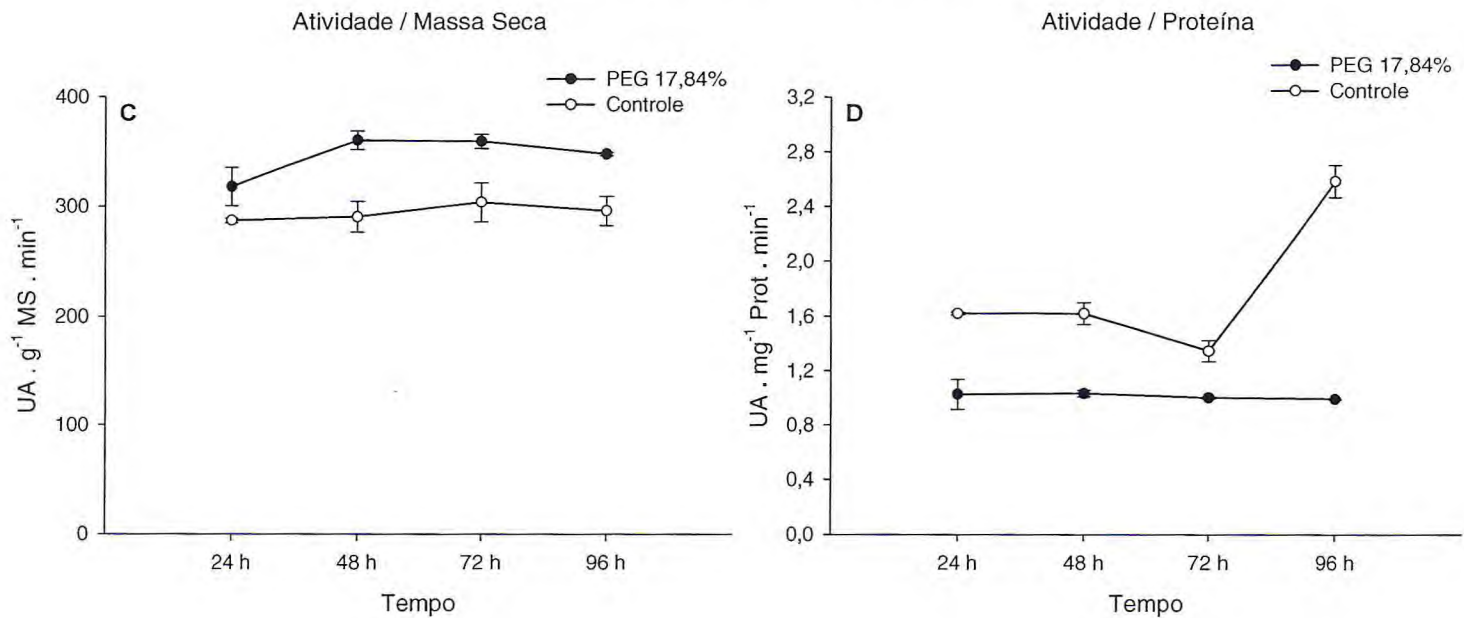
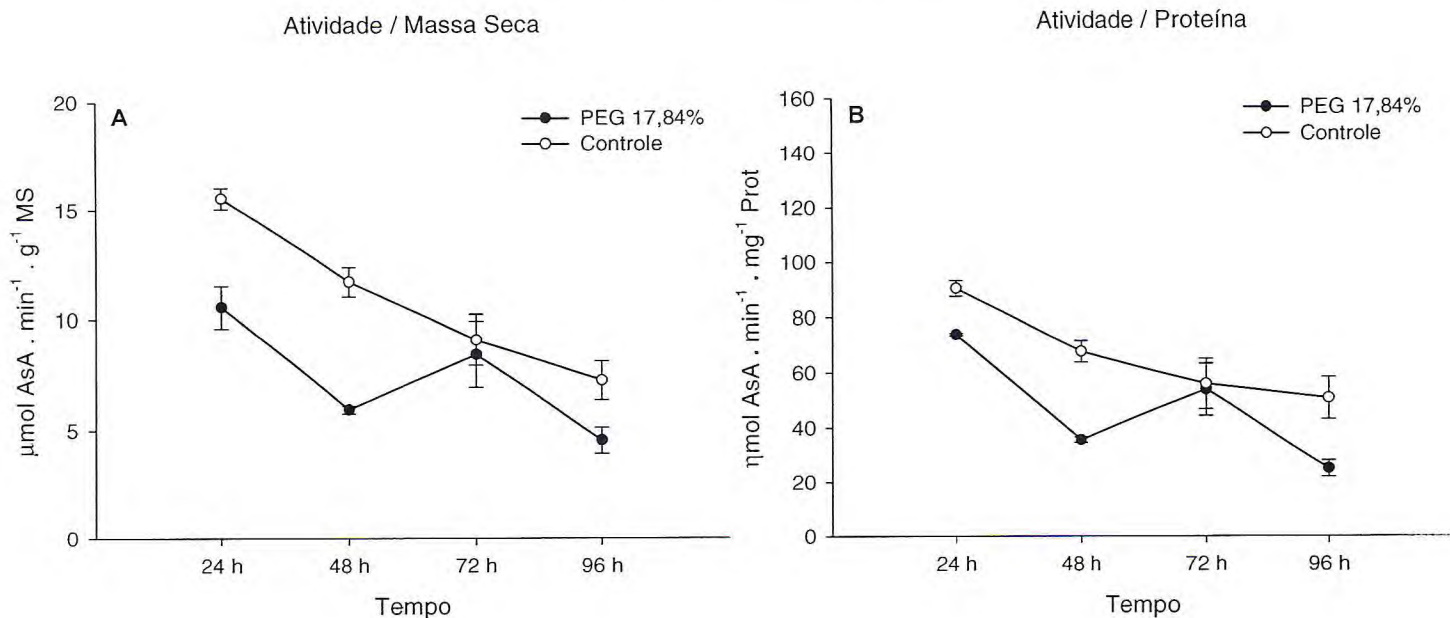


FIGURA 16 – Atividade de Dismutases de Superóxidos (SOD). (A) Atividade na base de Massa Seca e (B) Atividade na base de Proteínas, em condições controladas de câmara de crescimento. (C) Atividade na base de Massa Seca e (D) Atividade na base de Proteínas em condições de casa de vegetação. (O) representam as plantas Controle e (●) as submetidas a estresse hídrico induzido por PEG. Os dados representam médias  $\pm$  desvio padrão de 3 plantas.

## APX - Câmara de Crescimento



## APX - Casa de Vegetação

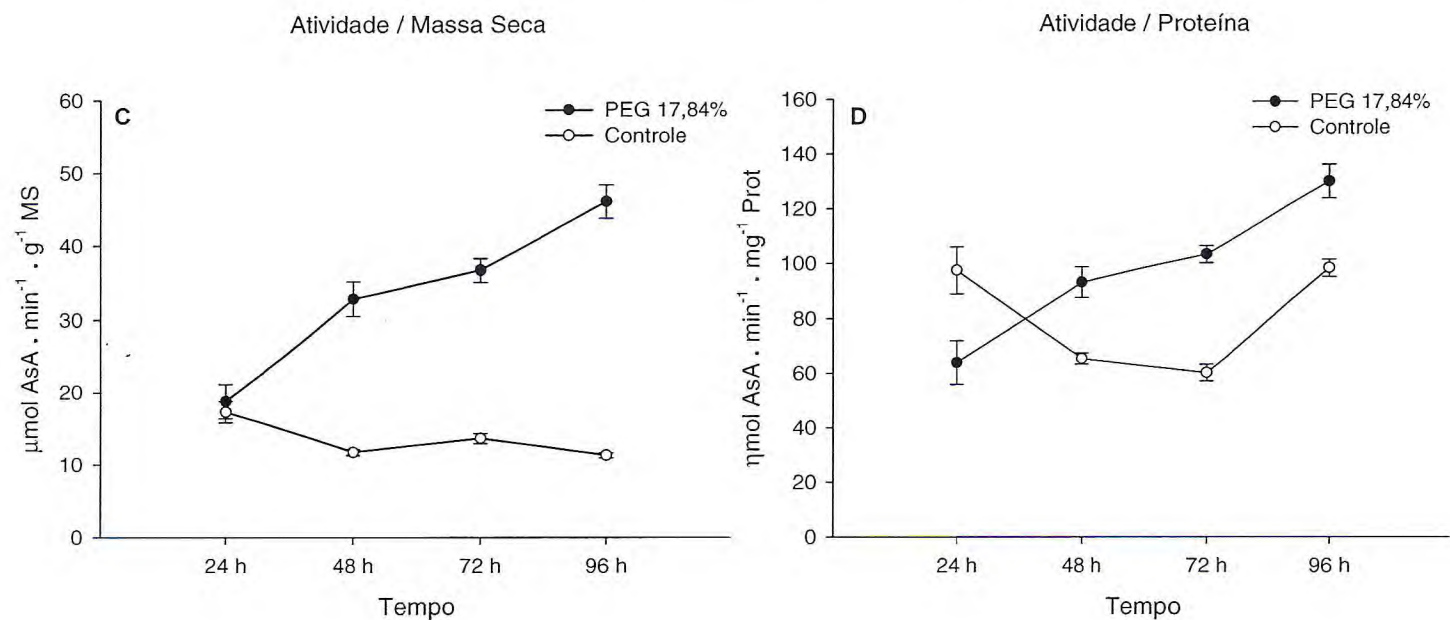
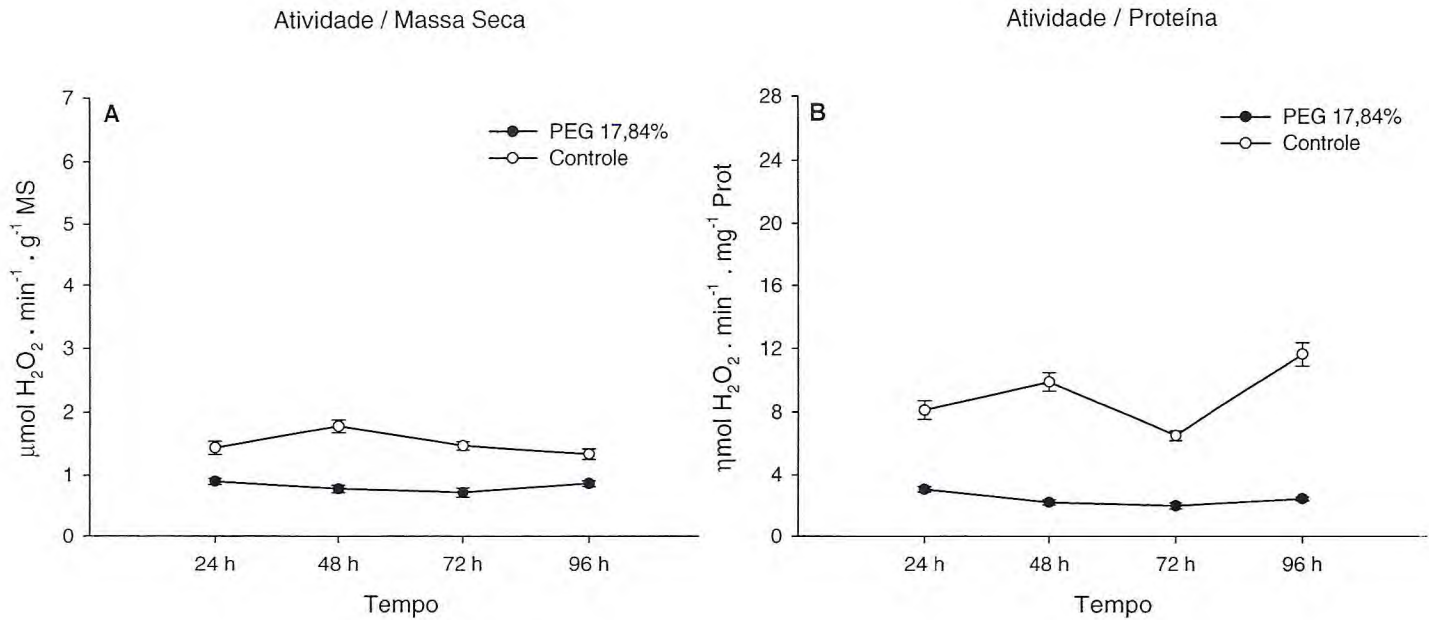


FIGURA 17 – Atividade de Peroxidasas de Ascorbato (APX). (A) Atividade na base de Massa Seca e (B) Atividade na base de Proteínas, em condições controladas de câmara de crescimento. (C) Atividade na base de Massa Seca e (D) Atividade na base de Proteínas em condições de casa de vegetação. (O) representam as plantas Controle e (●) as submetidas a estresse hídrico induzido por PEG. Os dados representam médias  $\pm$  desvio padrão de 3 plantas.

## CAT - Câmara de Crescimento



## CAT - Casa de Vegetação

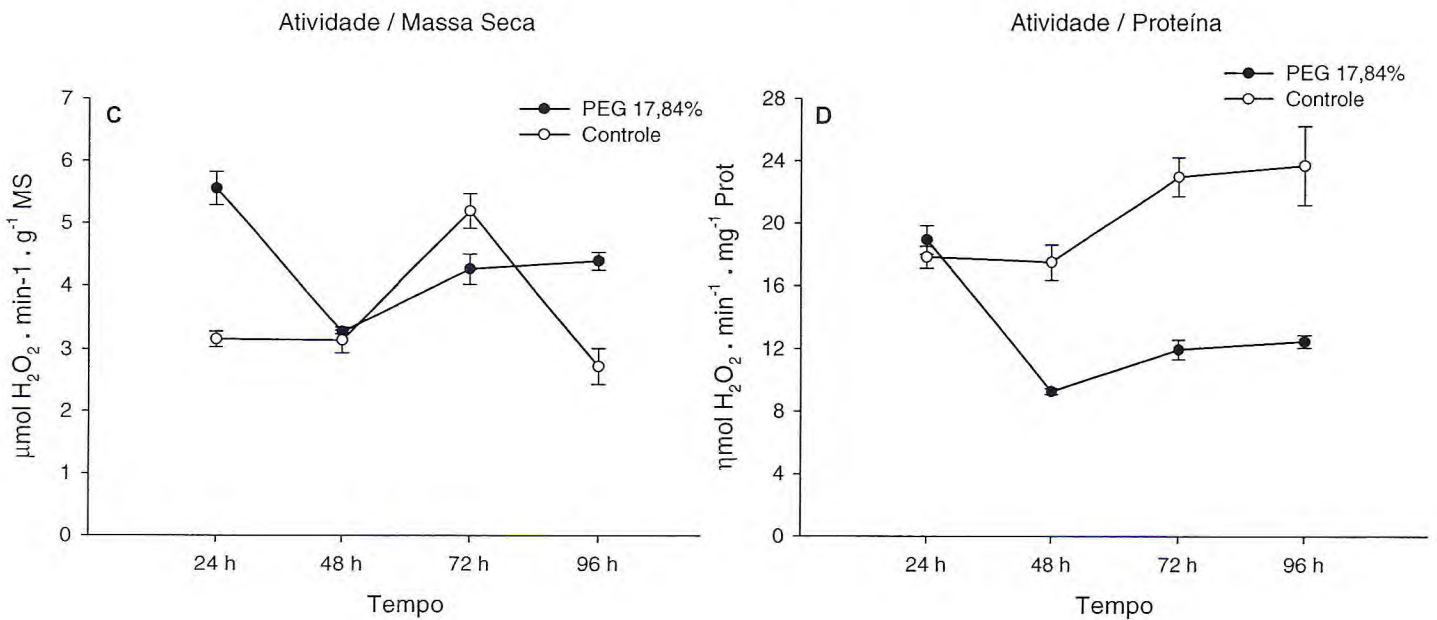


FIGURA 18 – Atividade de Catalases (CAT). (A) Atividade na base de Massa Seca e (B) Atividade na base de Proteínas, em condições controladas de câmara de crescimento. (C) Atividade na base de Massa Seca e (D) Atividade na base de Proteínas em condições de casa de vegetação. (○) representam as plantas Controle e (●) as submetidas a estresse hídrico induzido por PEG. Os dados representam médias  $\pm$ desvio padrão de 3 plantas.

## **7.2. Experimento II: Efeitos da aplicação do 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) no metabolismo oxidativo de plantas de feijão caupi submetidas ao estresse hídrico causado por PEG.**

Para verificar a importância dos sistemas antioxidantes das enzimas Catalase (CAT) e Peroxidase de Ascorbato (APX), as plantas de feijão caupi foram submetidas a uma aplicação de um conhecido inibidor de CAT, o 3-AT, em combinação com um estresse hídrico induzido pela aplicação de PEG. As plantas foram ainda submetidas a duas diferentes condições: em uma câmara de crescimento sob condições controladas de temperatura e luminosidade; e em condições de casa de vegetação, simulando as condições ambientais do semi-árido nordestino. Esta separação em 2 diferentes blocos ambientais foi realizada com o objetivo de verificar se a função da enzima CAT estaria mais associada com a eliminação de  $H_2O_2$  proveniente do processo de fotorrespiração. No momento da aplicação dos tratamentos, todas as plantas, em ambas as condições, estavam no mesmo estágio fisiológico, com o 1º trifólio completamente expandido e o 2º em fase inicial de expansão.

O estresse osmótico causado pela presença de PEG na solução nutritiva induziu uma diminuição do crescimento, semelhante à que foi descrita no Experimento I. Esta redução foi ainda maior quando este era aplicado em combinação com a pulverização de 3-AT na parte aérea. Este procedimento induziu severos danos nas folhas de feijão caupi, indicados pelo aparecimento de sintomas observáveis, a partir da 3ª aplicação do inibidor (FIGURA 19). O ambiente no qual as plantas foram tratadas exerceu uma influência no tempo de manifestação dos efeitos da aplicação do 3-AT. Nas plantas tratadas nas condições de casa de vegetação, registrou-se o aparecimento de necroses isoladas nos tecidos foliares a partir de 24 h da primeira pulverização de 3-AT, enquanto que nas plantas na câmara de crescimento, estes sintomas só eram evidenciados após 30 h (FIGURA 19B). Os sintomas apresentados por estas plantas durante a coleta (72 h após o início do experimento) foram observados anteriormente nas plantas cultivadas na casa de vegetação, no tempo de 48 h (FIGURA 19C e D).

O tratamento com 3-AT e PEG não induziu mudanças nos parâmetros fisiológicos de C.R.A. e % de Umidade de tecido (TABELA 7). Altos níveis de C.R.A. e de umidade no tecido foram mantidos pelas plantas de feijão caupi, mesmo no tratamento combinado de PEG e 3-AT (PEG+AT). No entanto, o ambiente exerceu efeito significativo ( $P < 0,05$ ) no indicador de C.R.A, quando comparado entre as plantas cultivadas na câmara de crescimento e na casa de vegetação. O tratamento com PEG não exerceu efeito no C.R.A. das plantas cultivadas



FIGURA 19 – Sintomatologia tempo-dependente da aplicação exógena por pulverização do 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT). (A) 8 horas após a 1ª Aplicação: são observadas pequenas regiões de leve clorose, com mudanças na textura do tecido; (B) Entre 24h e 30h: aparecimento de regiões de necrose isoladas; (C) Entre 48 e 72 h: expansão das regiões necrosadas às extremidades da folha; (D) Sintomas da aplicação de 3-AT em combinação com o tratamento de PEG 17,84%, nas condições de casa de vegetação, 48 h após o início do experimento: dessecamento do tecido foliar, associado à intensa clorose e a expansão de regiões de necrose, das extremidades para a nervura. Fotos retiradas com câmera digital, resolução 2048x1536, distância focal 5-8 mm (grande angular), tempo de exposição 1/80 s, ISO-100.

TABELA 7 – Indicadores Fisiológicos do Experimento II (PEG x 3-AT) em condições de câmara de crescimento e de casa de vegetação após 72 h de tratamento. % Umidade, Conteúdo Relativo de Água (C.R.A.) e Potencial Osmótico do exsudato celular total de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*.

Amostra	Ambiente					
	Câmara de Crescimento			Casa de Vegetação		
	% Umidade	C. R. A.	$\Psi_s$ (-MPa)	% Umidade	C. R. A.	$\Psi_s$ (-MPa)
<b>Controle</b>	92,499±0,618ab	87,336±3,531ab	-0,76±0,0271b	92,122±1,066a	89,876±1,680a	-0,72±0,0217b
<b>PEG</b>	91,384±0,272b	84,785±2,909ab	-1,09±0,0647a	91,663±0,540a	78,421±6,560b	-0,95±0,0374a
<b>PEG + 3-AT</b>	90,922±0,692b	82,413±2,228b	-0,99±0,0764a	92,750±0,940a	78,154±0,646b	-0,99±0,0410a
<b>3-AT</b>	92,977±0,891a	89,566±1,789a	-0,78±0,0103b	92,555±1,365a	82,411±2,473ab	-0,76±0,0096b

Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 Vaso com 2 plantas) ± Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ).



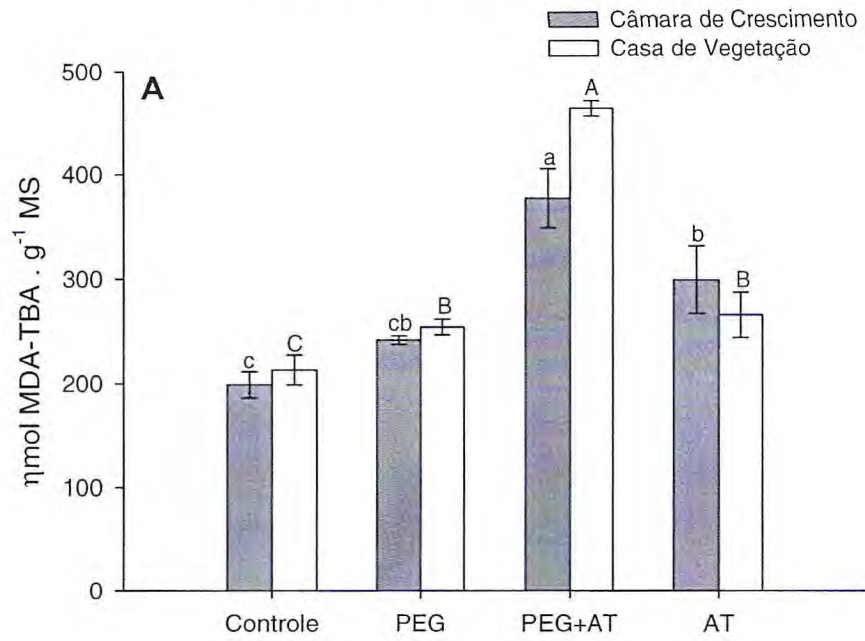
na câmara de crescimento, embora o tenha feito nas plantas submetidas as condições de casa de vegetação. Os valores mensurados de Potencial Osmótico ( $\Psi_s$ ) do suco celular de folhas das plantas tratadas com PEG apresentaram reduções significativas, quando comparadas aos das plantas controle, em ambas as condições de cultivo. Entretanto, não foi observado efeito do ambiente neste valor (TABELA 7).

Quando comparados aos controles, as plantas tratadas apenas com 3-AT mostraram um incremento na peroxidação de lipídeos, evidenciado pelo indicador de TBARS, de valores semelhantes aos apresentados pelas plantas submetidas ao PEG (FIGURA 20A). Já as plantas submetidas ao tratamento combinado de PEG+AT apresentaram os maiores valores deste indicador, em ambas as condições ambientais, com valores de aproximadamente duas vezes em relação aos do controle. Este aumento era ainda maior do que a soma dos incrementos das plantas tratadas com 3-AT e PEG isoladamente. A combinação de tratamentos influenciou também na acumulação de  $H_2O_2$ , embora este aumento tenha sido mais incipiente em relação aos controles. Interessantemente, os valores do conteúdo desta AOS nos tratamentos de PEG mantiveram-se nos mesmos níveis ou um pouco abaixo dos tratamentos controles, nas condições de câmara de crescimento e de casa de vegetação, respectivamente (FIGURA 20B). Já as plantas estressadas apenas com 3-AT, apresentaram comportamentos contrastantes no conteúdo de  $H_2O_2$ , entre os diferentes ambientes testados: enquanto que na câmara de crescimento o conteúdo desta AOS foi semelhante aos das plantas Controle e PEG, na casa de vegetação, houve um aumento de cerca de 20% em comparação a estes mesmos valores.

As plantas submetidas a estresse (PEG, PEG+AT ou AT) apresentaram um maior conteúdo da forma reduzida do antioxidante Ascorbato ( $AsA_{Red.}$ ), em ambas as condições ambientais estudadas (FIGURA 21A). Da mesma maneira do que o observado no indicador de TBARS, a combinação de estresses levou a uma maior acumulação de  $AsA_{Red}$  ( $P < 0,05$ ). Entretanto, nas condições de casa de vegetação, o nível deste antioxidante no tratamento de AT não apresentou diferença significativa em relação ao observado no tratamento de PEG, contrastando com o ambiente da câmara de crescimento, onde os níveis de  $AsA_{Red}$  neste tratamento foram menores. Apesar de algumas diferenças significativas, as mesmas tendências na acumulação de ascorbato foram observadas em ambos os ambientes estudados. Quanto ao conteúdo de proteínas solúveis totais presentes nos extratos obtidos nenhuma diferença significativa foi encontrada entre todos os tratamentos (FIGURA 21B).

A atividade da enzima SOD foi induzida pelos tratamentos com 3-AT (PEG+AT e AT), tanto nas condições da câmara de crescimento como nas da casa de vegetação (FIGURA 22A e B). Entretanto, enquanto que na primeira condição a atividade desta enzima no tratamento com PEG apresentou uma leve indução, na segunda, uma redução foi observada

## Peroxidação de Lipídeos - TBARS



## H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

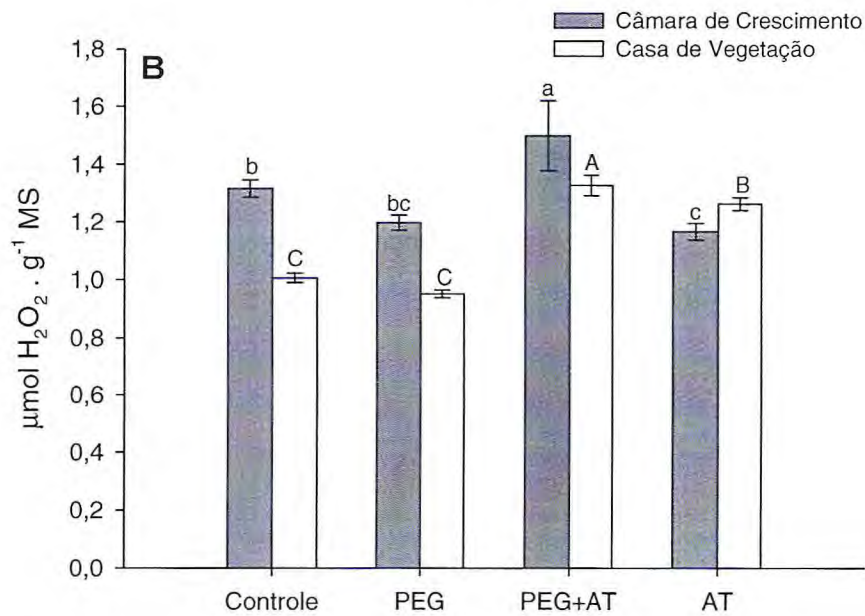


FIGURA 20 – (A) Peroxidação de Lipídeos (TBARS) e (B) Conteúdo de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (■) e de Casa de Vegetação (□), respectivamente. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas) ± Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade (p < 0,05). PEG – PEG 17,84%; PEG+AT – PEG17,84% + 3-AT 10 mM; AT – 3-AT – 10 mM (Ver Estratégia Experimental).

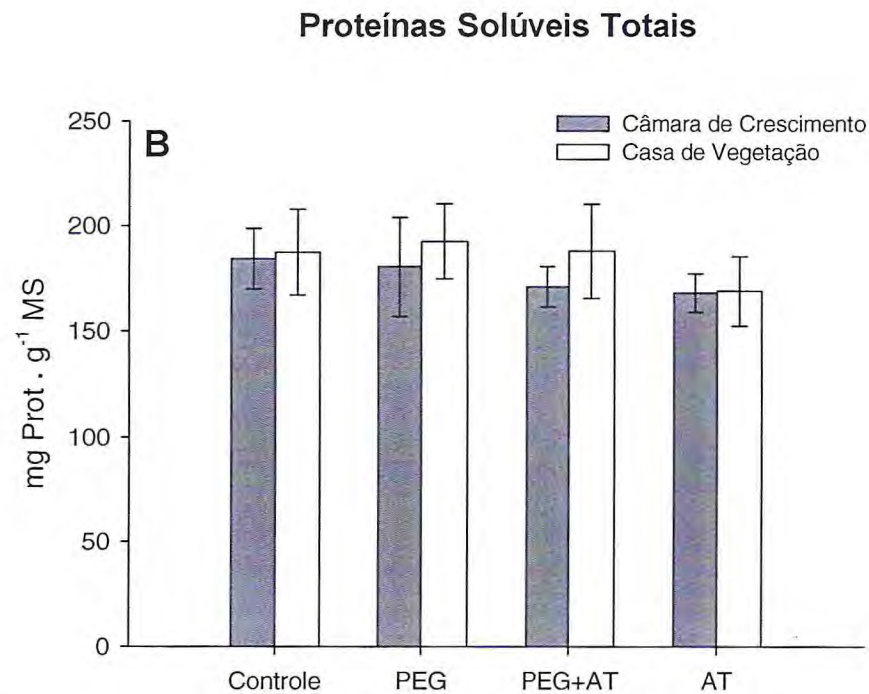
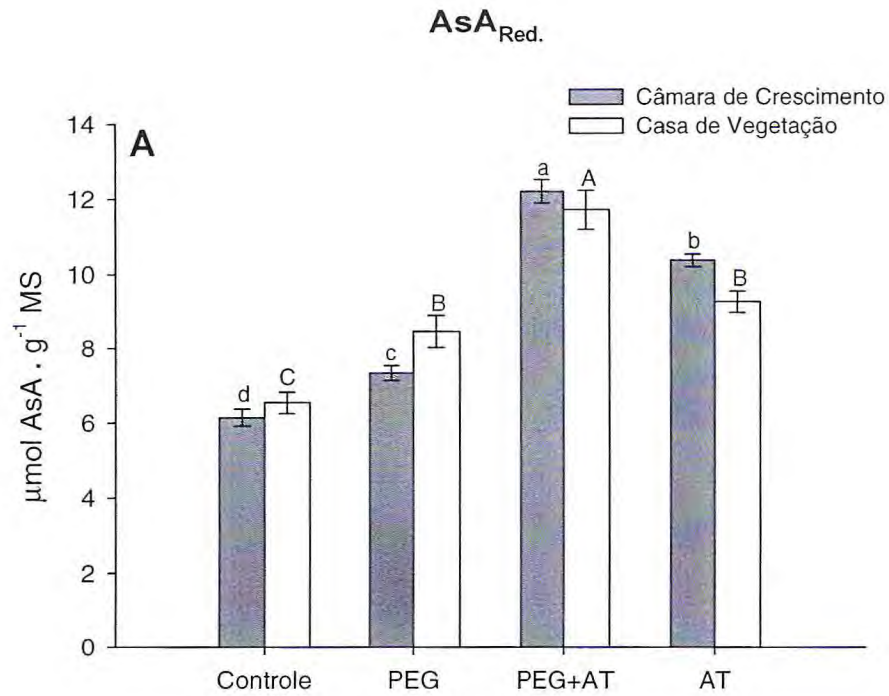


FIGURA 21 – (A) Conteúdo de Ascorbato Reduzido (AsA<sub>Red.</sub>) e (B) Proteínas Solúveis Totais de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (■) e de Casa de Vegetação (□), respectivamente. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas) ±Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade (p<0,05). PEG – PEG 17,84%; PEG+AT – PEG17,84% + 3-AT 10 mM; AT – 3-AT – 10 mM (Ver Estratégia Experimental).

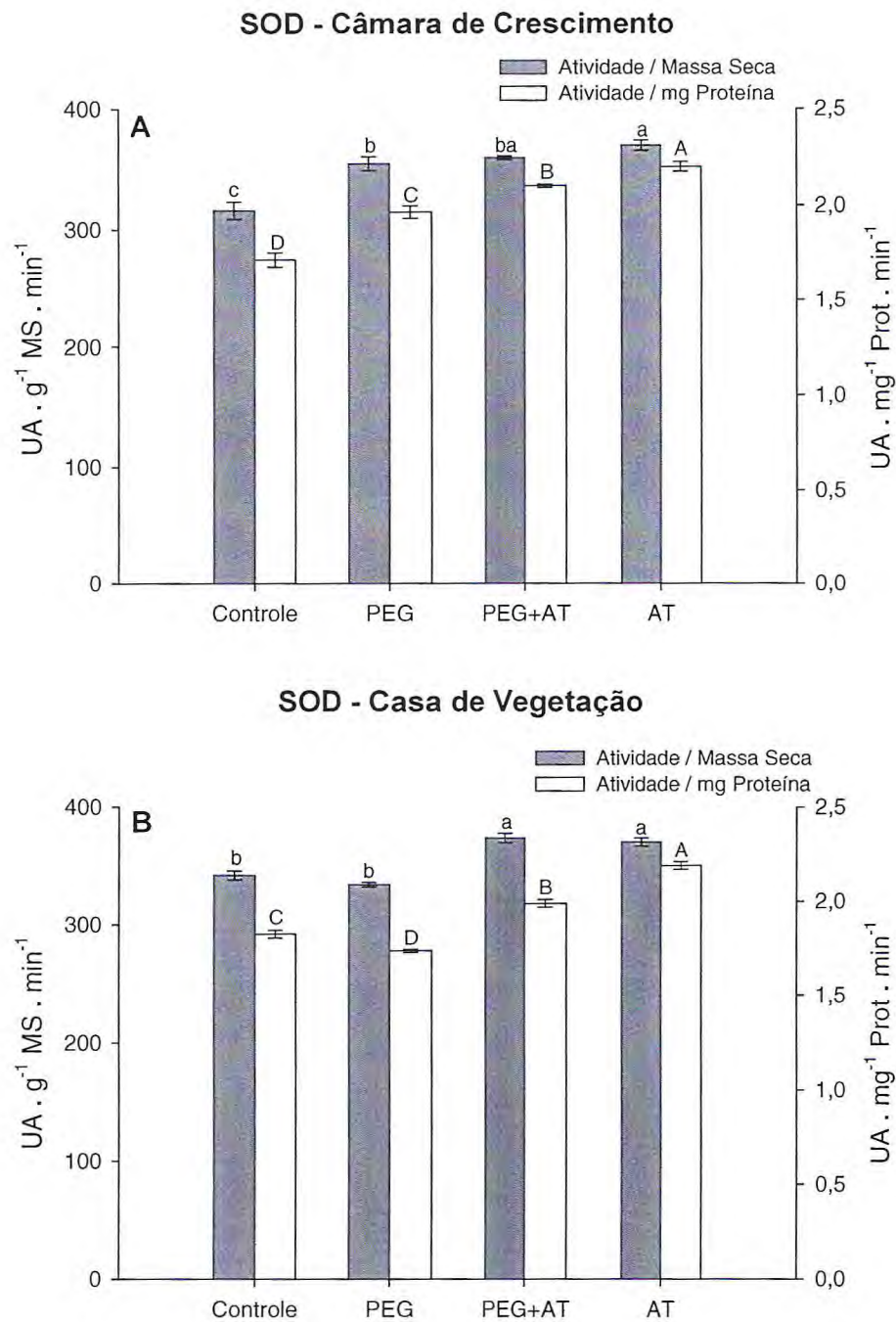


FIGURA 22 – Atividade Enzimática de Dismutases de Superóxido (SODs) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (A) e de Casa de Vegetação (B). Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). (Ver Estratégia Experimental).

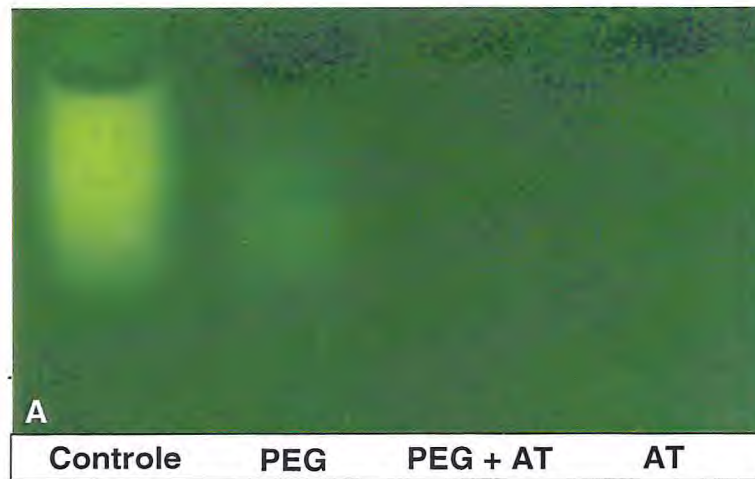
em relação ao controle. Embora este aumento tenha sido quantitativamente pequeno, ele foi significativo ( $P < 0,05$ ). Como não houve alterações significantes no conteúdo de proteínas solúveis totais, os resultados de atividade enzimática na base de massa seca (MS) e na base de mg de proteínas se apresentaram bem similares.

Como esperado, a aplicação do 3-AT induziu uma abrupta redução nos níveis de atividade enzimática de CAT. Nas condições da câmara de crescimento, a redução na atividade desta enzima nos tratamentos PEG+AT e AT chegou a ser 16 vezes menor que a atividade registrada para as plantas Controle (FIGURA 23B). Na atividade em gel, nenhuma zona de descoloração associada à atividade de CAT foi observada nestas amostras, e apenas uma leve descoloração foi evidenciada nas provenientes dos tratamentos de PEG (FIGURA 23A). Nas plantas cultivadas na casa de vegetação, essa redução da atividade foi menor, da ordem de 4 vezes (FIGURA 24A). Entretanto nestas condições, mesmo as plantas Controle apresentaram menores valores de atividade (FIGURA 24B). Os tratamentos com PEG também apresentaram diminuição significativa na atividade desta enzima ( $P < 0,05$ ) em relação às plantas Controle, em cada condição experimental.

Uma tendência inversa a da atividade de CAT foi evidenciada na atividade de APX, principalmente nas plantas conduzidas na câmara de crescimento (FIGURA 25A). A atividade desta enzima foi significativamente incrementada em todos os tratamentos, em especial no tratamento com 3-AT quando tomados por referência os valores das plantas Controle. Também de forma inversa à da CAT, a atividade de APX apresentou valores maiores nas condições de casa de vegetação, e um aumento ainda maior nas plantas tratadas com 3-AT (FIGURA 25B). Neste ambiente, uma leve queda na atividade desta enzima no tratamento de PEG contrastou com o aumento observado na câmara de crescimento, em relação aos controles.

Os tratamentos de estresse não induziram grandes alterações no padrão de expressão protéica, como indicado pelo SDS-PAGE (FIGURA 26A). Aparentemente, a aplicação de 3-AT, independentemente da presença ou ausência de PEG, exerceu uma forte repressão, apenas em uma proteína, de peso molecular aparente de 66 kDa, como pode ser observado na FIGURA 26A, nos poços C, D, G e H. O imunoblot realizado com as mesmas amostras, utilizando um anticorpo contra um peptídeo sintético obtido a partir do alinhamento das seqüências de aminoácidos de CATs, revelou apenas uma única banda, também de peso molecular aparente de 66 kDa. Mesmo com diferenças incipientes, a revelação com o anticorpo nas amostras provenientes das plantas Controle parece ter sido levemente mais intensa (FIGURA 26B).

## Câmara de Crescimento



## CAT

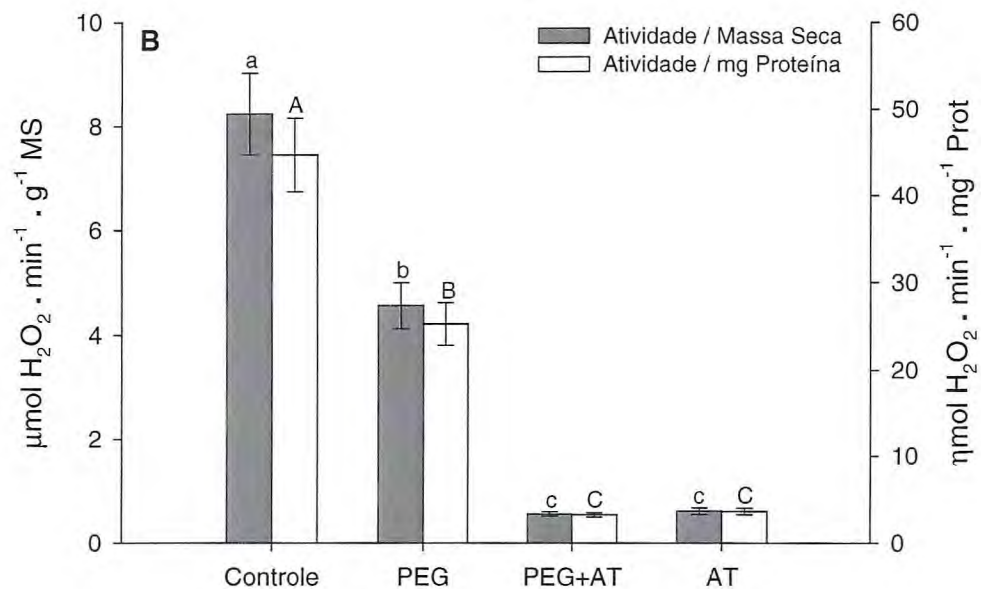
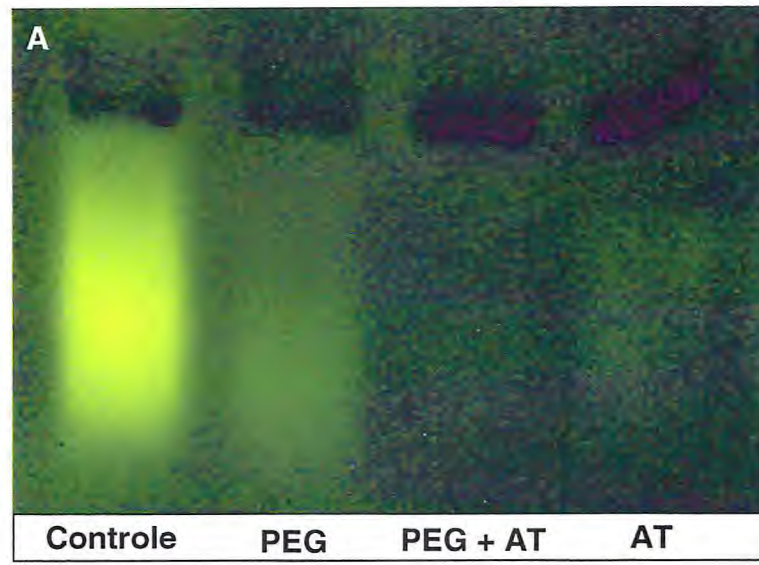


FIGURA 23 – Atividade Enzimática da Catalase (CAT) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento. (A) Atividade em Gel (Zimograma). (B) Atividade *in vitro*. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). (Ver Estratégia Experimental).

## Casa de Vegetação



## CAT

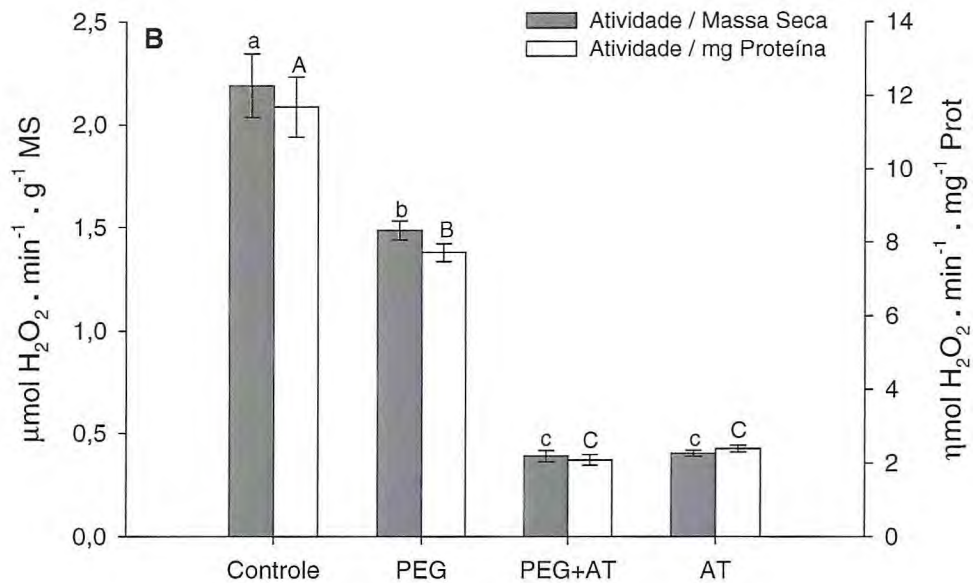
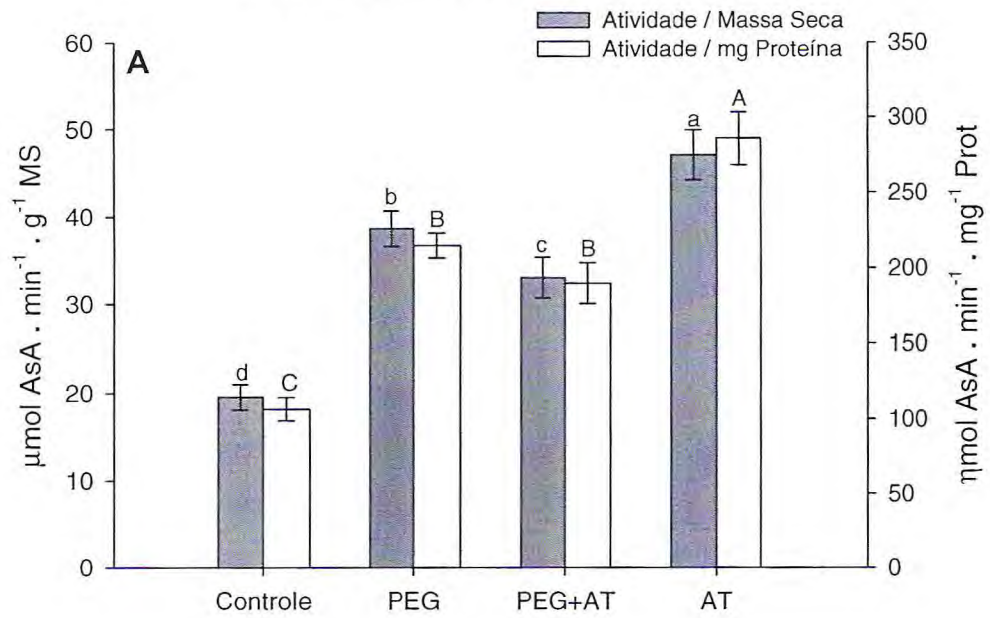


FIGURA 24 – Atividade Enzimática da Catalase (CAT) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Casa de Vegetação. (A) Atividade em Gel (Zimograma). (B) Atividade *in vitro*. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). (Ver Estratégia Experimental).

### APX - Câmara de Crescimento



### APX - Casa de Vegetação

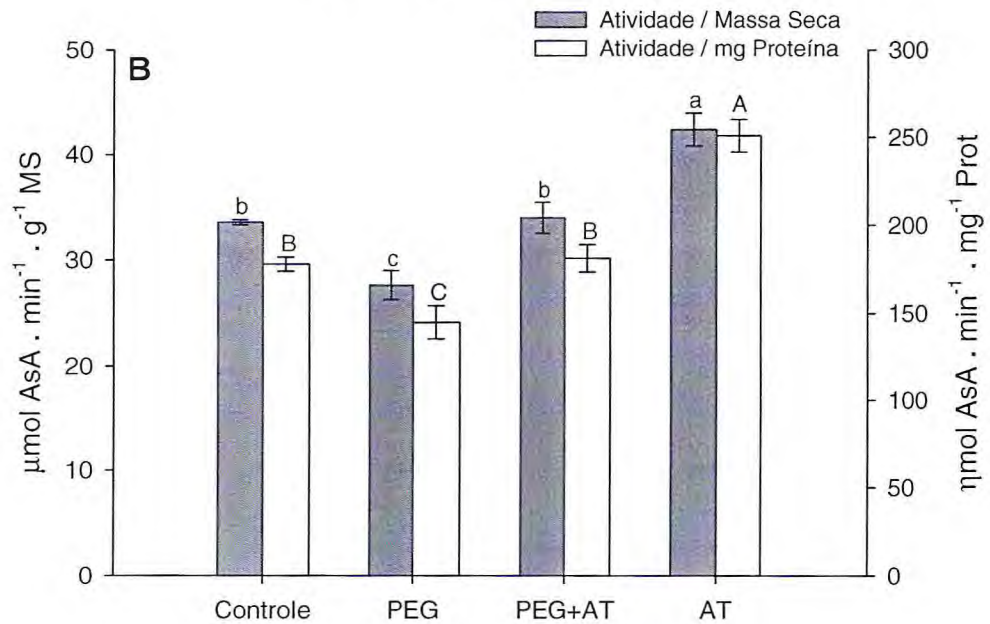


FIGURA 25 – Atividade Enzimática de Peroxidasas de Ascorbato (APXs) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (A) e de Casa de Vegetação (B). Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). (Ver Estratégia Experimental).



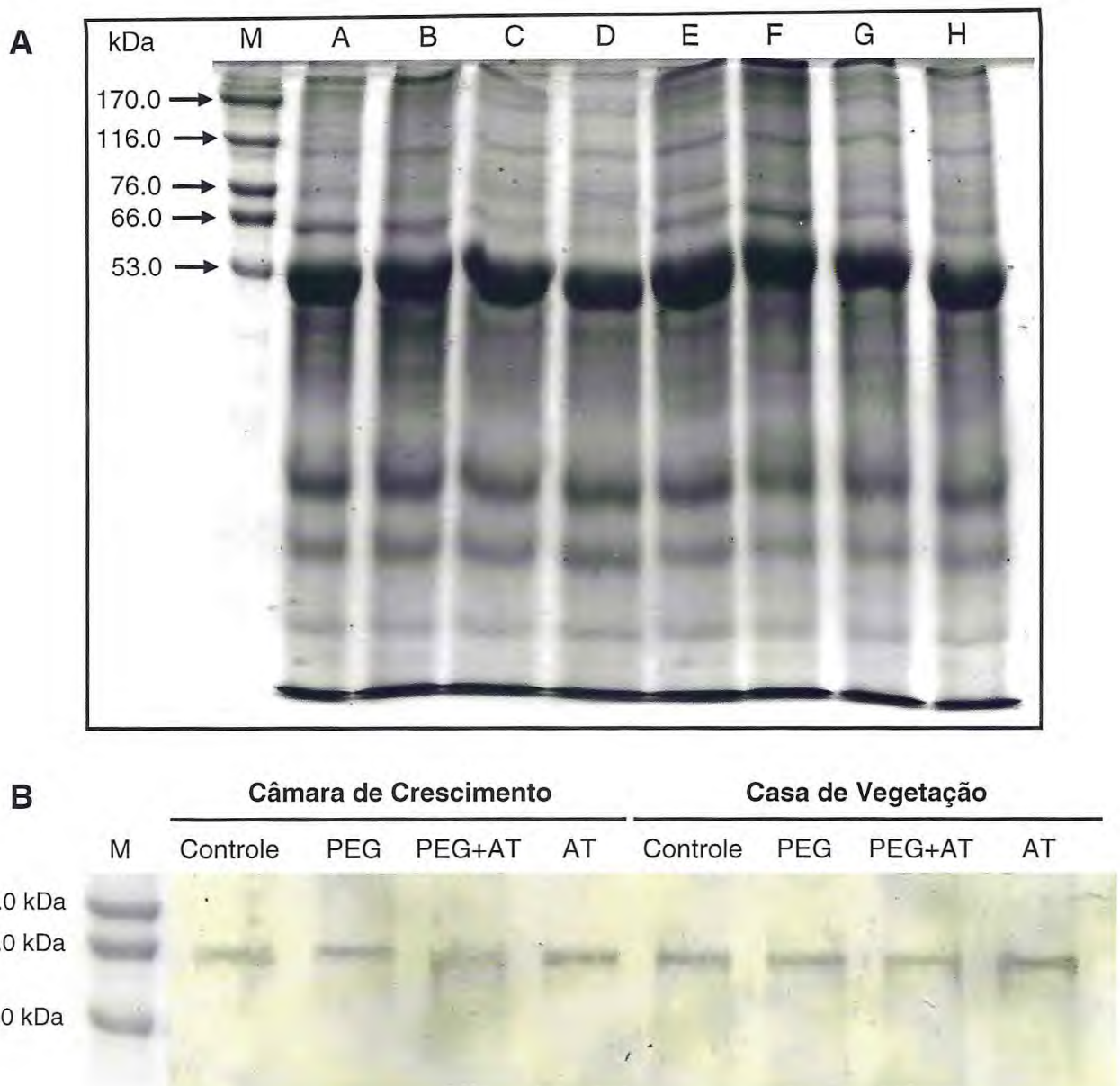


FIGURA 26 – (A) SDS-PAGE de proteínas de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de câmara de crescimento (poços A-D) e de Casa de Vegetação (poços E-H). M – Marcador de Peso Molecular. Foram aplicados 20  $\mu$ L do extrato de proteínas solúveis totais ( $\cong$ 40  $\mu$ g) por poço. Câmara de Crescimento: A – Amostras Controle; B – Amostras tratadas com PEG 17,84%; C – Amostras tratadas com PEG 17,84% e 3-AT 10 mM; D – Amostras apenas tratadas com 3-AT. Casa de Vegetação: E – Controle; F – PEG 17,84%; G – PEG 17,84% + 3-AT 10 mM; H – 3-AT. (B) Imunoblot de catalases, nas amostras acima relatadas, utilizando o anticorpo produzido contra o peptídeo sintético, desenhado a partir do alinhamento de seqüências primárias de CATs provenientes de outras espécies (Ver Estratégia Experimental).

De acordo com a avaliação da expressão pela técnica de RT-PCR quantitativo, os níveis de expressão do transcrito do gene constitutivo *ef1 $\alpha$*  foram similares em todos os tratamentos e em ambas as condições estudadas (FIGURAS 27A a 30A). Como esperado, a mesma tendência não foi observada para a expressão dos transcritos de *cat* e de *cApx*, que mostraram alterações na sua expressão, de acordo com o tratamento aplicado. A curva de desnaturação observada para os fragmentos amplificados com os iniciadores para o mRNA da CAT, mostrou pico de ampla faixa, indicando a provável amplificação de outros transcritos para diferentes isoformas de CAT (FIGURA 27B). O mesmo não foi observado na curva de desnaturação dos fragmentos amplificados com os iniciadores para o mRNA da cAPX, que apresentou um pico relativo a uma estreita faixa de temperatura (FIGURA 29B).

A FIGURA 31 relata os dados de expressão em relação aos controles, dos transcritos para a CAT e para a cAPX, nos diferentes tratamentos, normalizados com a expressão dos transcritos para o gene constitutivo *ef1 $\alpha$* . A expressão dos mRNAs para a enzima CAT sofreu uma forte repressão, em todos os tratamentos estudados, em ambas as condições ambientais de experimentação. Esta repressão foi ainda maior no tratamento combinado, PEG+AT (FIGURA 31A). Estes dados mostraram-se relacionados com os dados da atividade enzimática da CAT (FIGURAS 23 e 24). Esta mesma relação foi observada entre a acumulação de mRNA da cAPX e a atividade total de APX. Houve um aumento gradativo dos transcritos de *cApx*, em todos os tratamentos realizados na presença de 3-AT, em ambas as condições ambientais testadas (FIGURA 31B).

## Câmara de Crescimento

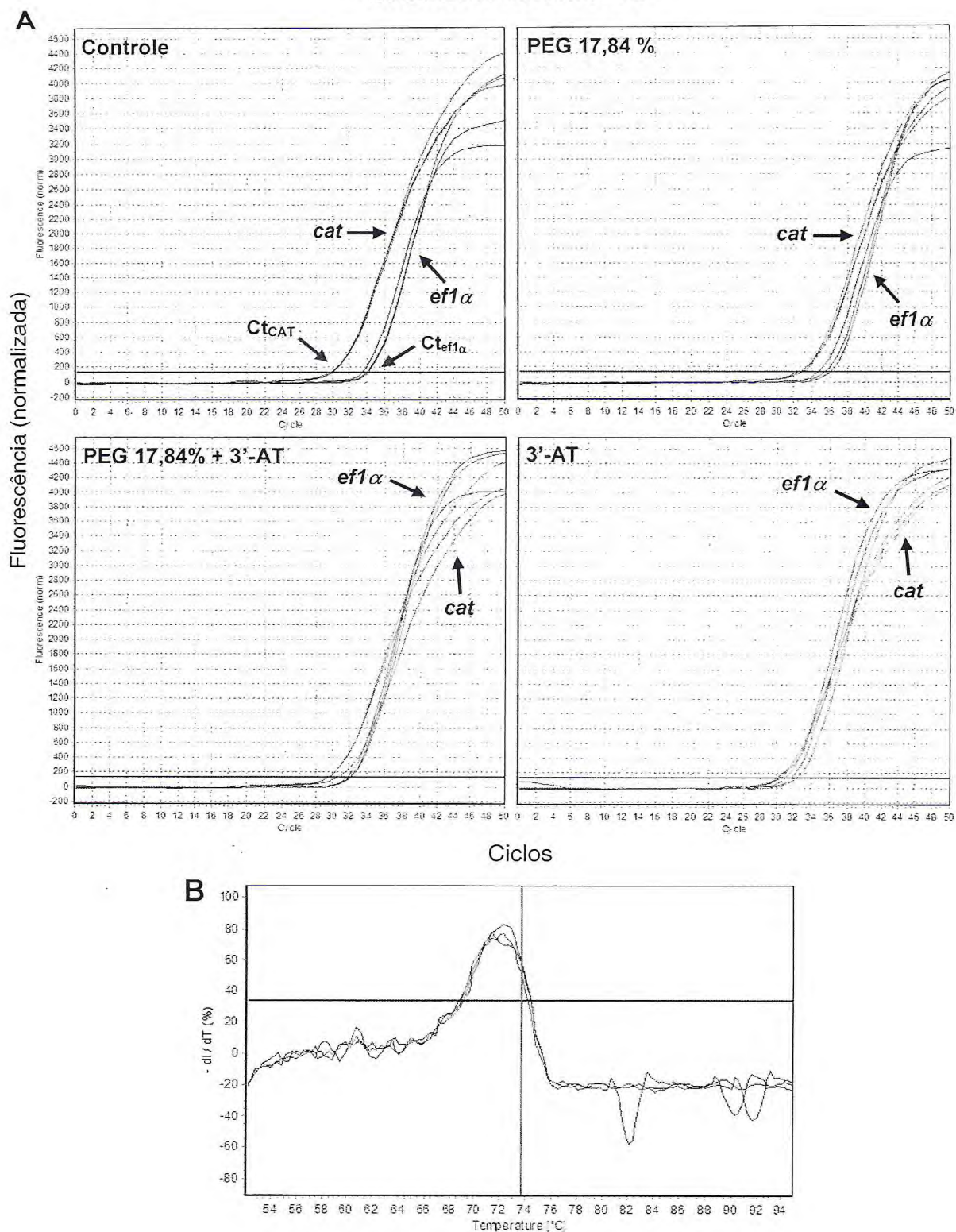


FIGURA 27 – (A) Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *cat* e *ef1 $\alpha$*  (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao  $C_T$  (B) Curva de desnaturação dos fragmentos amplificados, relativo à amostra Controle. (Ver Estratégia Experimental).

Casa de Vegetação

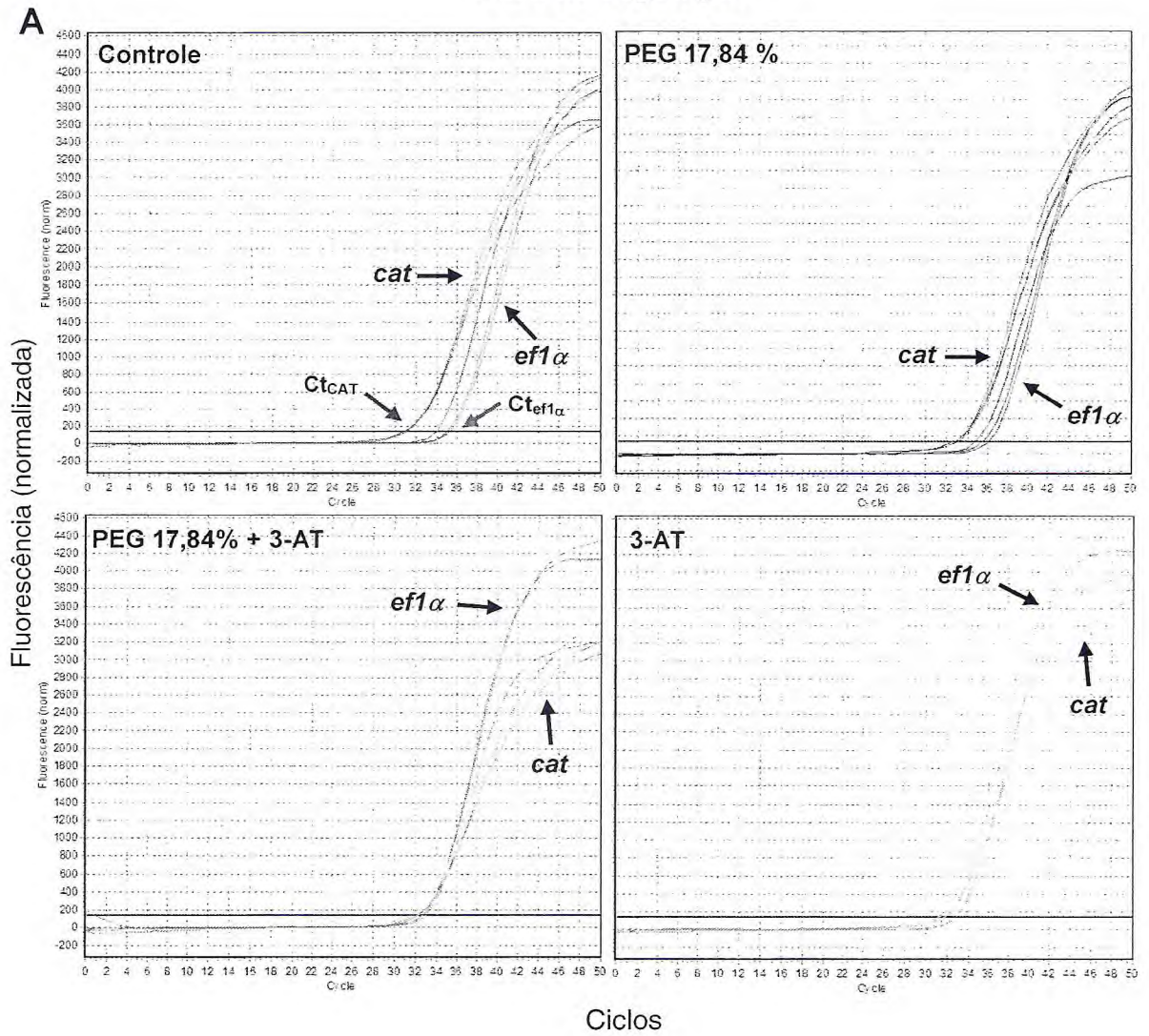


FIGURA 28 – Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *cat* e *ef1α* (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Casa de Vegetação. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao C<sub>T</sub>. (Ver Estratégia Experimental).

## Câmara de Crescimento

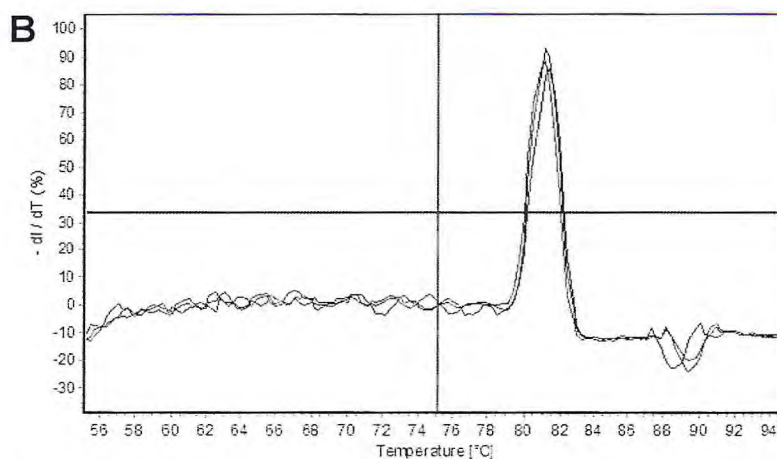
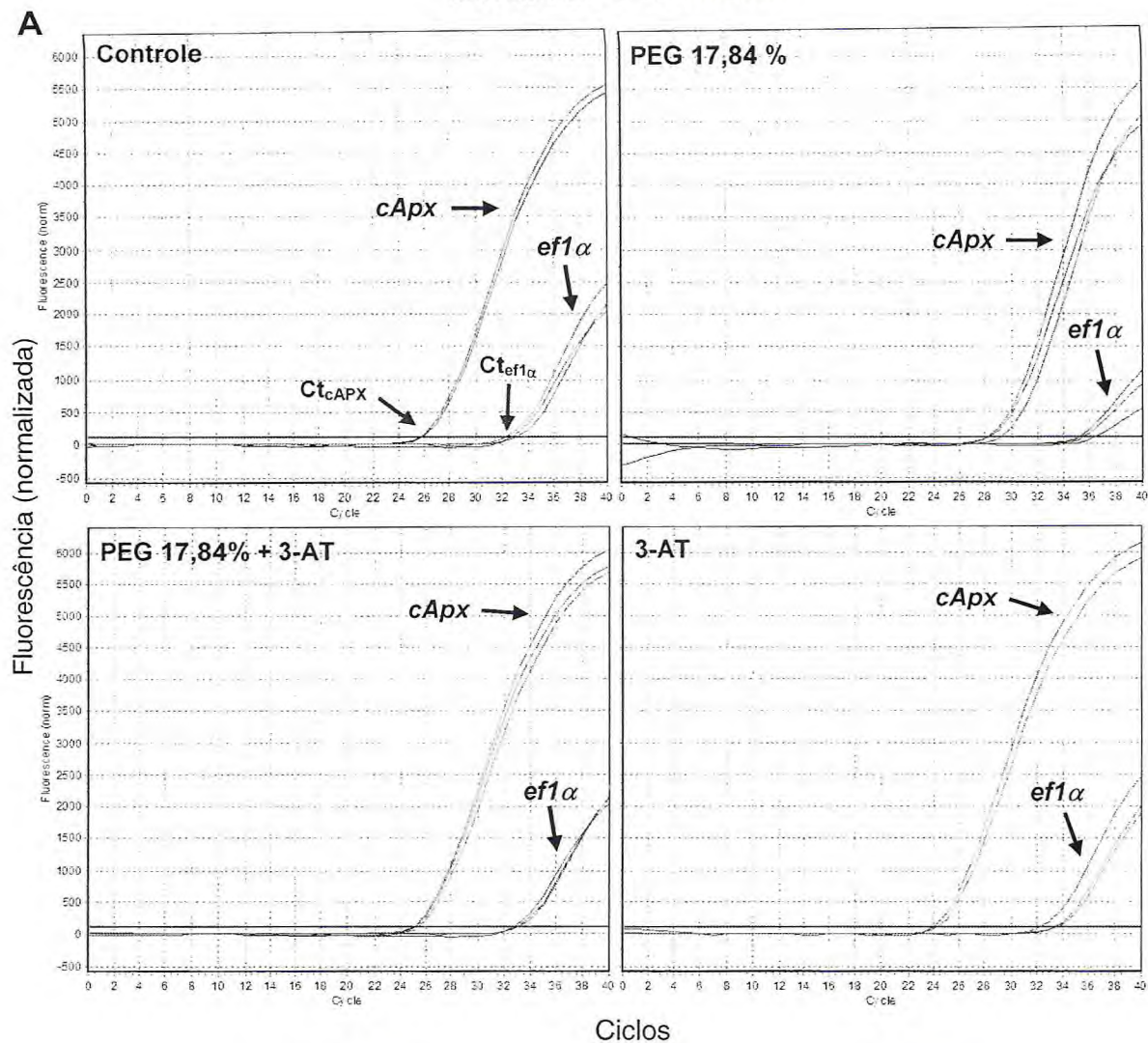


FIGURA 29 – (A) Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *capx* e *ef1α* (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao  $C_T$  (B) Curva de desnaturação dos fragmentos amplificados, relativo à amostra Controle. (Ver Estratégia Experimental).

### Casa de Vegetação

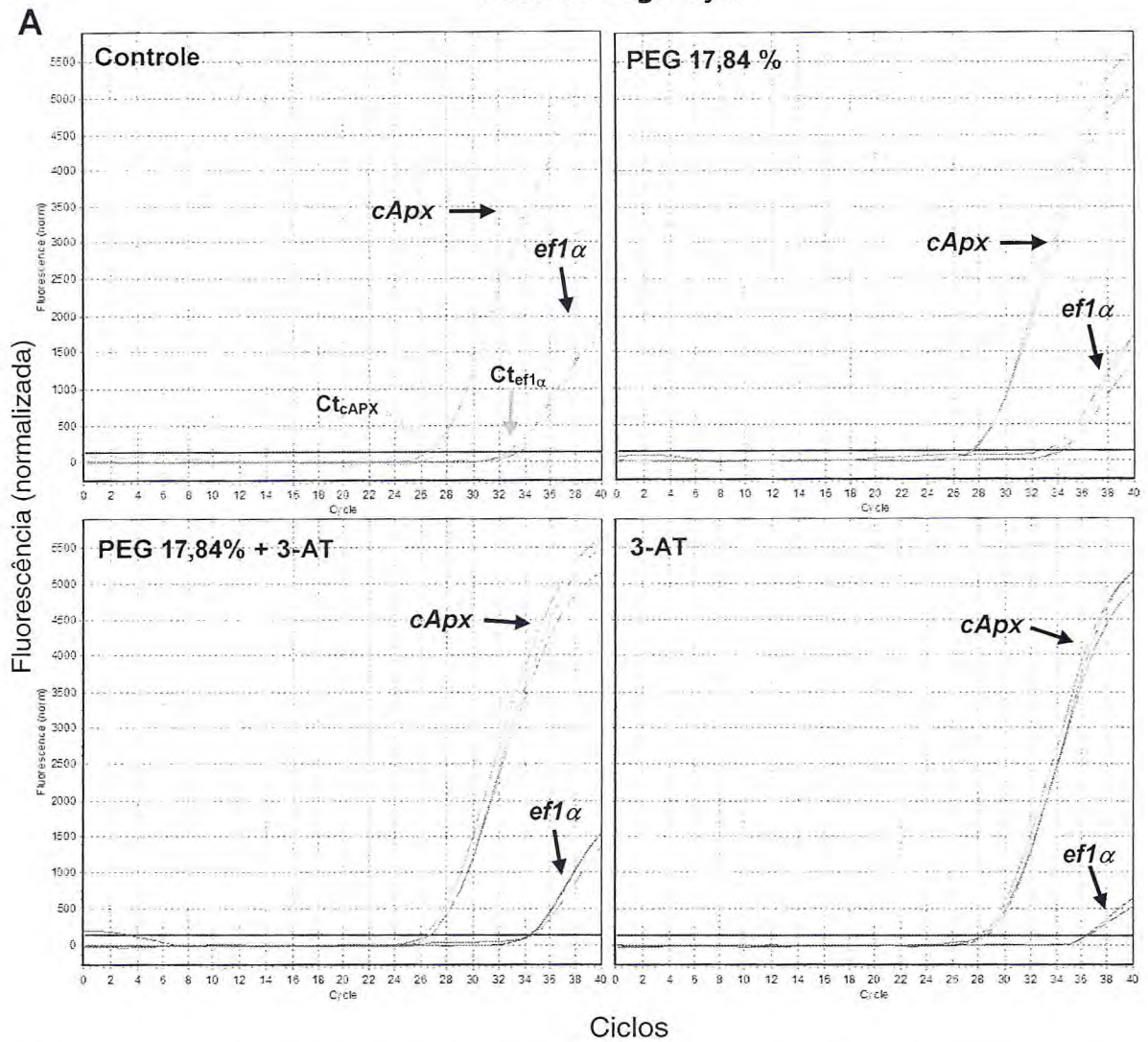


FIGURA 30 – Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *capx* e *ef1α* (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Casa de Vegetação. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao  $C_T$ . (Ver Estratégia Experimental).

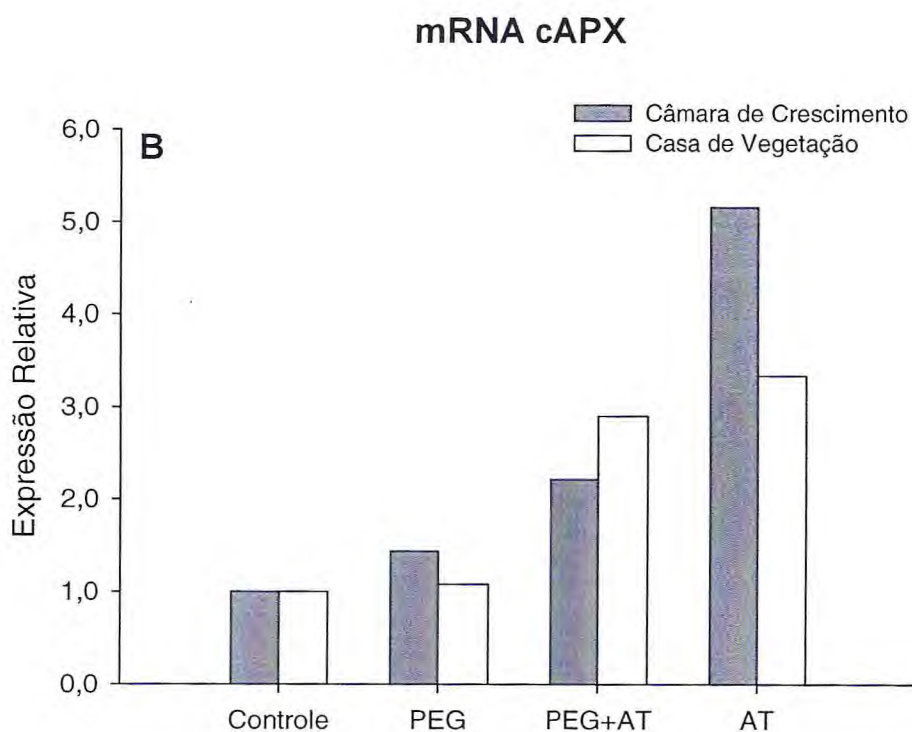
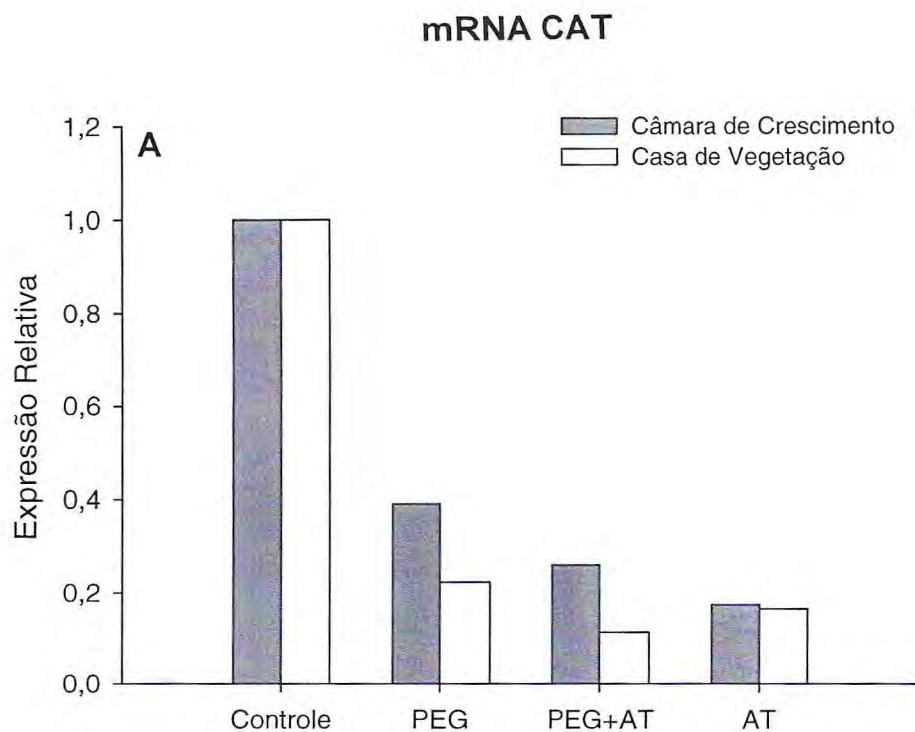


FIGURA 31 – Nível de expressão dos transcritos do gene para a enzima CAT (A) e para a enzima cAPX normalizados com o nível de expressão dos transcritos do gene constitutivo *ef1 $\alpha$*  (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de crescimento (■) e de Casa de Vegetação (□), respectivamente. Cálculos realizados a partir do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , descrito por Livak & Schmittgen (2001).

### **7.3. Experimento III: Avaliação de parâmetros fisiológicos e das respostas antioxidantes de plantas de feijão caupi submetidas ao estresse salino causado por NaCl e expostas ao 3-AT.**

Para verificar se os mecanismos antioxidativos enzimáticos de folhas de feijão caupi apresentam estratégias comuns sob diferentes estresses abióticos, testou-se o efeito da combinação do 3-AT com um estresse salino, induzido por NaCl. As plantas foram então submetidas às mesmas condições ambientais testadas nos Experimentos I e II, para uma avaliação do efeito do ambiente associado a uma condição de salinidade. No momento da aplicação dos tratamentos, todas as plantas se encontravam no mesmo estágio fisiológico, padronizado nos experimentos anteriores, ou seja, 1º trifolíolo completamente expandido e o 2º em fase inicial de expansão.

Assim como o observado para o estresse hídrico induzido por PEG (Experimentos I e II), a aplicação de uma concentração de 100 mM de NaCl, na solução nutritiva, exerceu um acentuado efeito no crescimento das plantas. A partir de 24 h após a aplicação dos tratamentos, já se evidenciava uma redução no comprimento da parte aérea, mesmo nas plantas submetidas às condições controladas. Como esperado, outro efeito semelhante entre a aplicação de PEG e de NaCl, foi a drástica queda na transpiração associada a um aumento na resistência estomática (FIGURA 33A e B). No entanto, em 24 h e 48 h, os valores das taxas de transpiração das plantas tratadas com NaCl foram significativamente menores ( $P < 0,05$ ) do que os valores observados para as plantas tratadas com PEG, em concentrações iso-osmóticas. Em 72 h houve um acentuado aumento da resistência estomática nas plantas tratadas com NaCl, assim como o observado nas plantas com PEG (FIGURA 33B).

Em comparação com os sintomas observados no Experimento II, a aplicação de 3-AT em combinação com NaCl induziu sintomas bem mais severos, do que os registrados na combinação com PEG (FIGURA 32). No dia da coleta experimental, isto é, 72 h após a aplicação dos tratamentos, as folhas primárias das plantas tratadas com NaCl e 3-AT (NaCl+AT), nas condições de casa de vegetação, estavam em avançado estágio de clorose, com regiões de necrose expandidas em quase toda a área foliar. Nas folhas mais jovens (trifolioladas), apenas regiões de necroses isoladas eram observadas. Nas plantas tratadas apenas com 3-AT, estes sintomas de toxicidade também foram observados, no entanto, em menor severidade. Este tratamento induziu uma redução no crescimento semelhante à evidenciada em plantas estressadas com PEG e com NaCl.

O conteúdo do íon  $\text{Na}^+$  nos tecidos foliares das plantas tratadas com NaCl chegou a valores aproximados de 1500 mmol  $\text{Na}^+$  por kg de massa seca, indicando que estas plantas



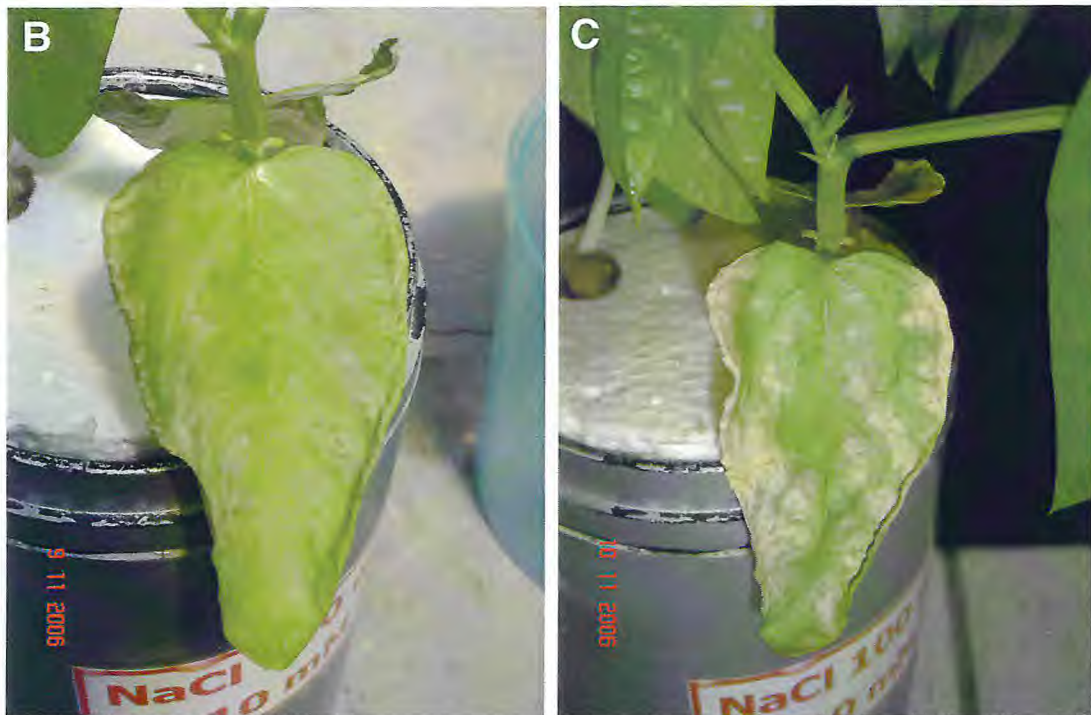
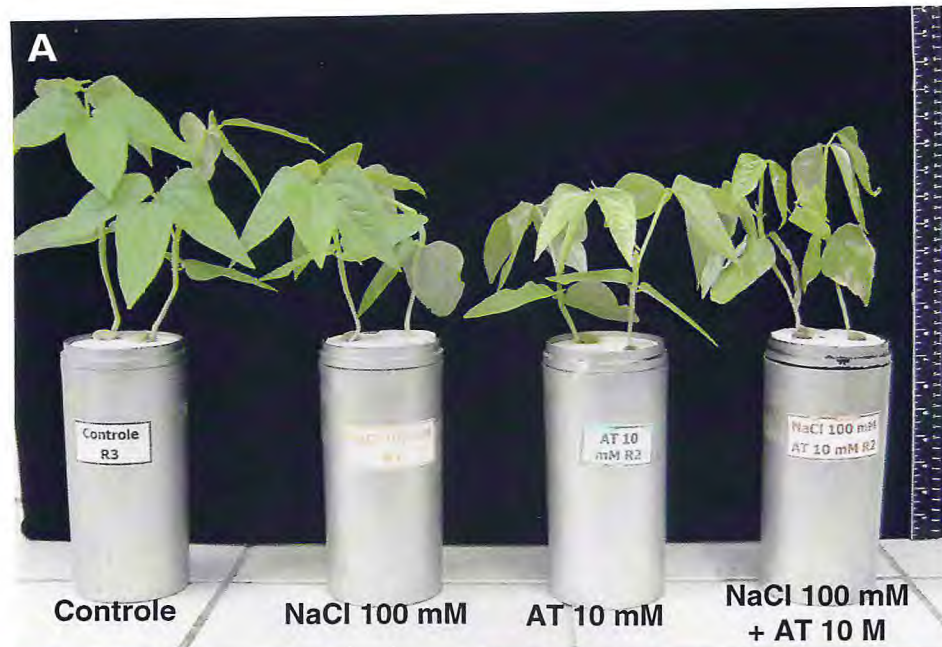


FIGURA 32 – (A) Aspecto Visual das plantas de *Vigna unguiculata* cv. Pitiúba, mantidas nas condições de casa de vegetação, no dia da coleta (72 h após a aplicação dos tratamentos de estresse). Sintomatologia da aplicação exógena por pulverização do 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) em combinação com o tratamento de NaCl (NaCl+AT): 48 h (B) e 72 h (C) após a aplicação dos tratamentos, nas condições de casa de vegetação. Fotos retiradas com câmera digital, resolução 2048x1536, distância focal 5-8 mm (grande angular), tempo de exposição 1/80 s, ISO-100.

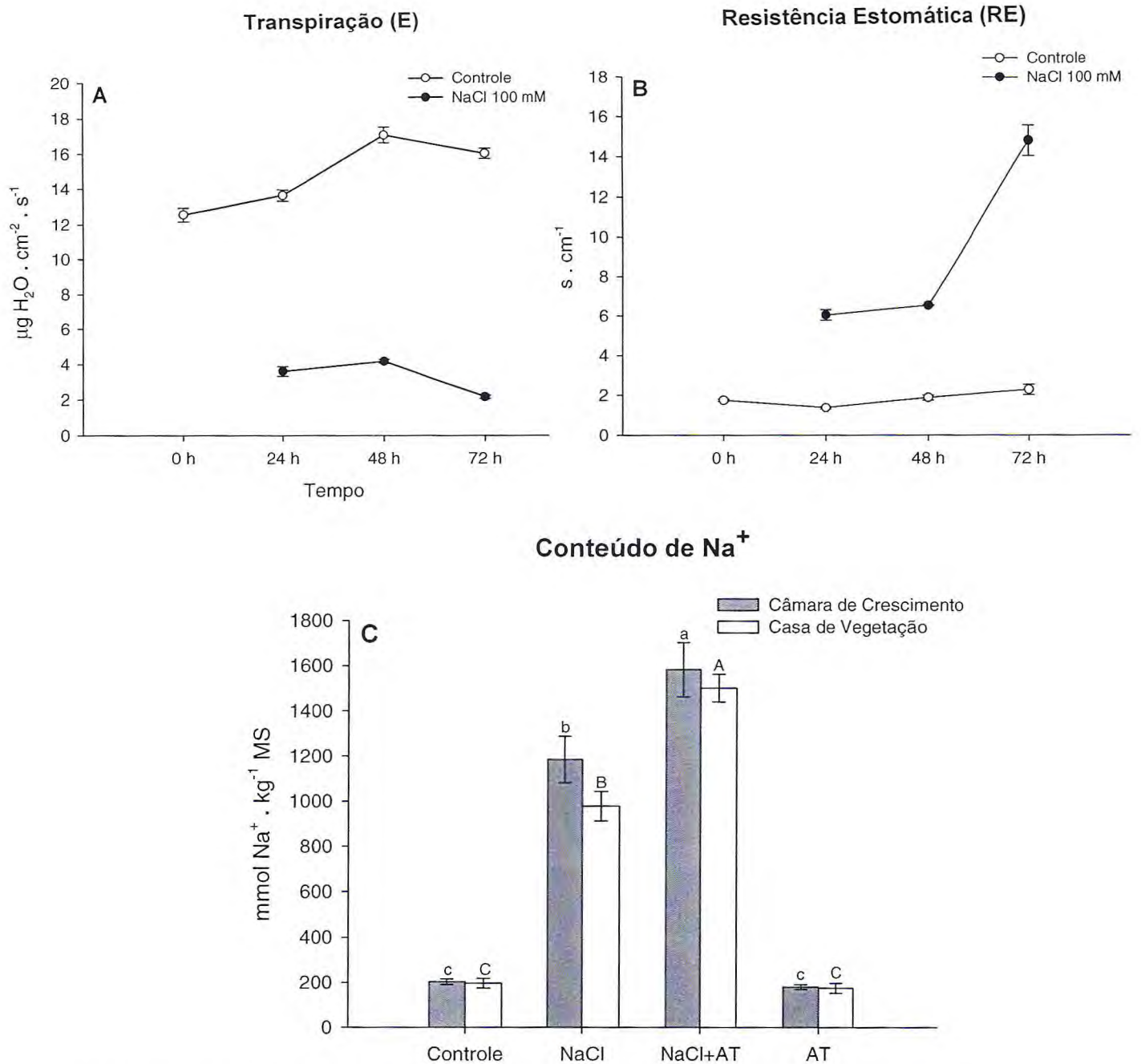


FIGURA 33 – (A) Taxas de transpiração e (B) Resistência Estomática (RE) de plantas de *V. unguiculata* submetidas a tratamento Controle (○) e a estresse hídrico induzido por PEG (●), nas condições de casa de vegetação. Os dados representam médias  $\pm$ desvio padrão de 4 plantas. (C) Conteúdo de Na<sup>+</sup> em tecidos foliares de plantas cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (■) e de Casa de Vegetação (□), respectivamente. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 Vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). NaCl – NaCl 100 mM; NaCl+AT – NaCl 100 mM + 3-AT 10 mM; AT – 3-AT 10 mM. (Ver Estratégia Experimental).

já estavam sob o efeito iônico do estresse salino. Curiosamente, os tecidos foliares das plantas submetidas ao tratamento combinado de NaCl e 3-AT apresentaram uma maior acumulação deste íon. A condição ambiental não exerceu influência significativa na passagem de  $\text{Na}^+$  para a parte aérea, diferentemente do que aconteceu nos parâmetros fisiológicos de C.R.A. e %Umidade. As plantas cultivadas em condições controladas apresentaram maiores valores nestes parâmetros, embora diferenças significativas não tenham sido observadas entre os tratamentos Controle e NaCl, dentro de um mesmo ambiente (TABELA 8). A redução nos valores de potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) do exsudato celular total de tecidos foliares de plantas tratadas com NaCl foi semelhante a obtida nos tratamentos de PEG, comprovando o fato de que os dois agentes estressores impuseram um estresse osmótico similar (TABELA 8).

Em contraste com o estresse hídrico induzido por PEG, as plantas tratadas com NaCl apresentaram diminuições significativas ( $P < 0,05$ ) no valor do indicador de TBARS, relativo a peroxidação de lipídeos, independentemente do ambiente de condução do experimento (FIGURA 34A). Em comparação com as plantas Controles, a aplicação do 3-AT induziu aumentos significativos nos valores deste indicador apenas em combinação com o NaCl. As plantas tratadas com 3-AT sem a presença do NaCl mantiveram valores semelhantes aos observados nas plantas controle. No entanto, a aplicação do inibidor de CAT teve uma significativa influência nos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (FIGURA 34B). Assim como no experimento anterior, o tratamento com NaCl na ausência de 3-AT não induziu aumentos no conteúdo desta AOS. Neste experimento, também foi observado um efeito do 3-AT, nos níveis do antioxidante não-enzimático  $\text{AsA}_{\text{Red}}$  (FIGURA 35A).

Nas condições da câmara de crescimento, as atividades registradas da enzima CAT, neste experimento, apresentaram as mesmas tendências do Experimento II. Neste ambiente, o estresse, seja ele causado por PEG ou por NaCl, induz uma forte repressão da atividade desta enzima (FIGURA 37A e B). Entretanto, nas condições da casa de vegetação, a atividade de CAT nas plantas tratadas com NaCl, manteve aproximadamente os níveis das plantas Controle, como pode ser observado na FIGURA 38. Já a atividade da APX foi induzida em todos os tratamentos de estresse (NaCl; NaCl+AT; AT), independente da condição ambiental testada (FIGURA 39).

O padrão de expressão protéica visualizado pelo SDS-PAGE com as amostras obtidas neste experimento foi semelhante ao obtido no Experimento II (FIGURA 40A). Apesar desta semelhança, o imunoblot realizado com as amostras do presente experimento, utilizando o anticorpo produzido contra o peptídeo sintético, revelou alterações no reconhecimento da CAT. Não houve reação de conhecimento nas amostras tratadas apenas com o NaCl. De forma contrastante, no tratamento combinado de NaCl e 3-AT houve um reconhecimento de

duas proteínas: uma mais forte, próxima a proteína marcadora de 66 kDa; e uma outra de revelação extremamente fraca, um pouco mais abaixo, na faixa dos 63-64 kDa (FIGURA 40B). Uma forte repressão no mRNA para a enzima CAT em todos os tratamentos de estresse também foi evidenciada (FIGURA 45A). Da mesma maneira que no experimento anterior, esta repressão veio acompanhada por uma acentuada indução dos mRNAs para a APX citossólica. O próprio tratamento de NaCl parece exercer uma forte influência na expressão da cAPX, independente da condição ambiental testada (FIGURA 45B).

TABELA 8 – Indicadores Fisiológicos obtidos no Experimento III (NaCl x 3-AT) em condições de câmara de crescimento e de casa de vegetação após 72 h de tratamento. % Umidade, Conteúdo Relativo de Água (C.R.A.) e Potencial Osmótico do exsudato celular total de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*.

Amostra	Ambiente					
	Câmara de Crescimento			Casa de Vegetação		
	% Umidade	C. R. A.	$\Psi_s$ (-MPa)	% Umidade	C. R. A.	$\Psi_s$ (-MPa)
<b>Controle</b>	96,054±0,275a	95,069±5,628a	-0,66±0,0578b	90,668±0,5232a	87,809±1,4279a	-0,70±0,0228b
<b>NaCl</b>	96,020±0,303a	96,916±1,526a	-1,14±0,0604a	91,418±0,2128a	90,492±0,9081a	-1,15±0,0619a
<b>NaCl + 3-AT</b>	-	-	-1,26±0,0747a	-	-	-1,34±0,0786a
<b>3-AT</b>	-	-	-0,75±0,0573b	-	-	-0,70±0,0096b

Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 Vaso com 2 plantas) ± Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ).

## Peroxidação de Lipídeos - TBARS

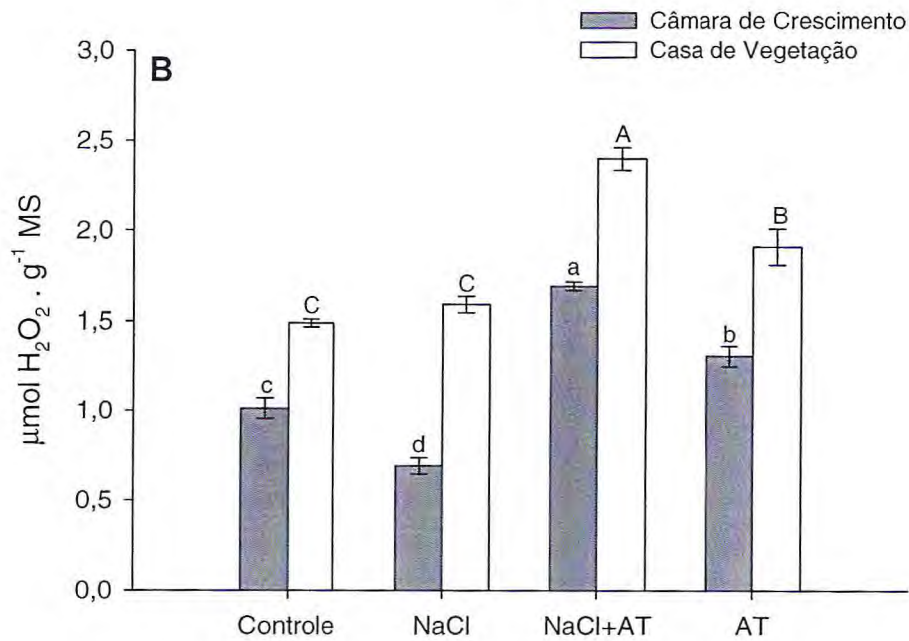
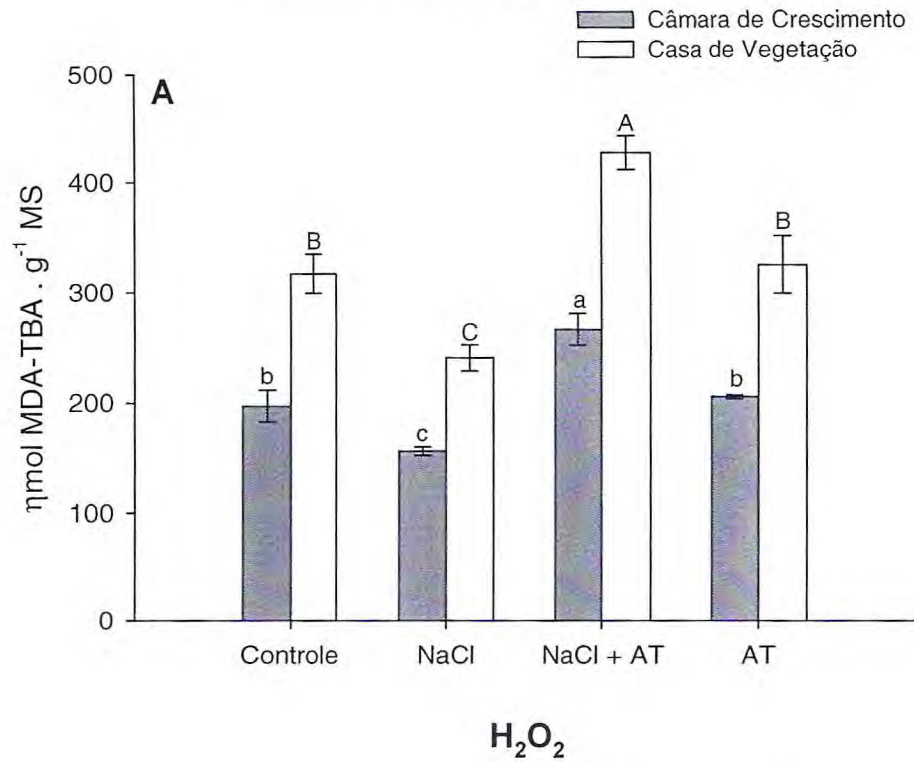


FIGURA 34 – (A) Peroxidação de Lipídeos (TBARS) e (B) Conteúdo de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (■) e de Casa de Vegetação (□), respectivamente. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas) ± Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade (p < 0,05). NaCl – NaCl 100 mM; NaCl+AT – NaCl 100 mM + 3-AT 10 mM; AT – 3-AT 10 mM. (Ver Estratégia Experimental).

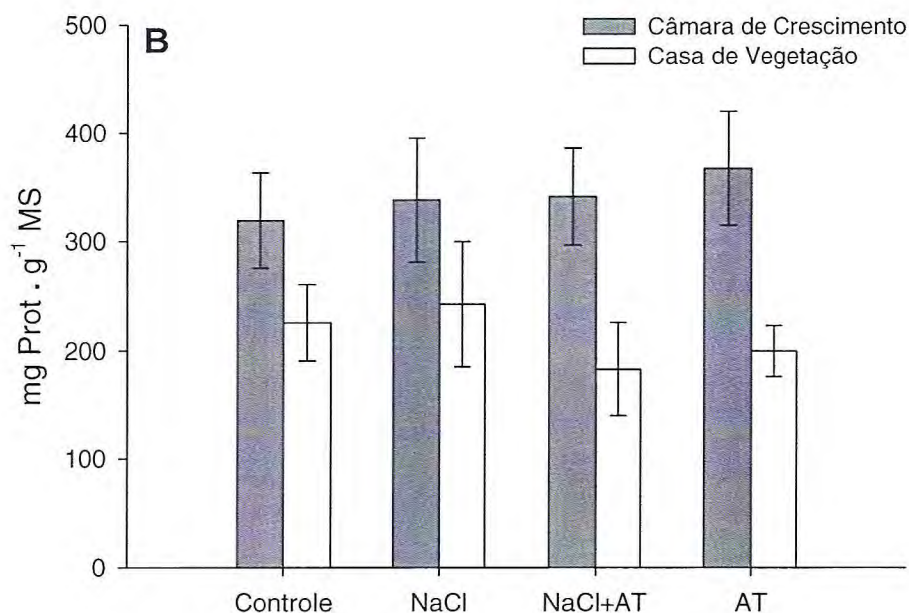
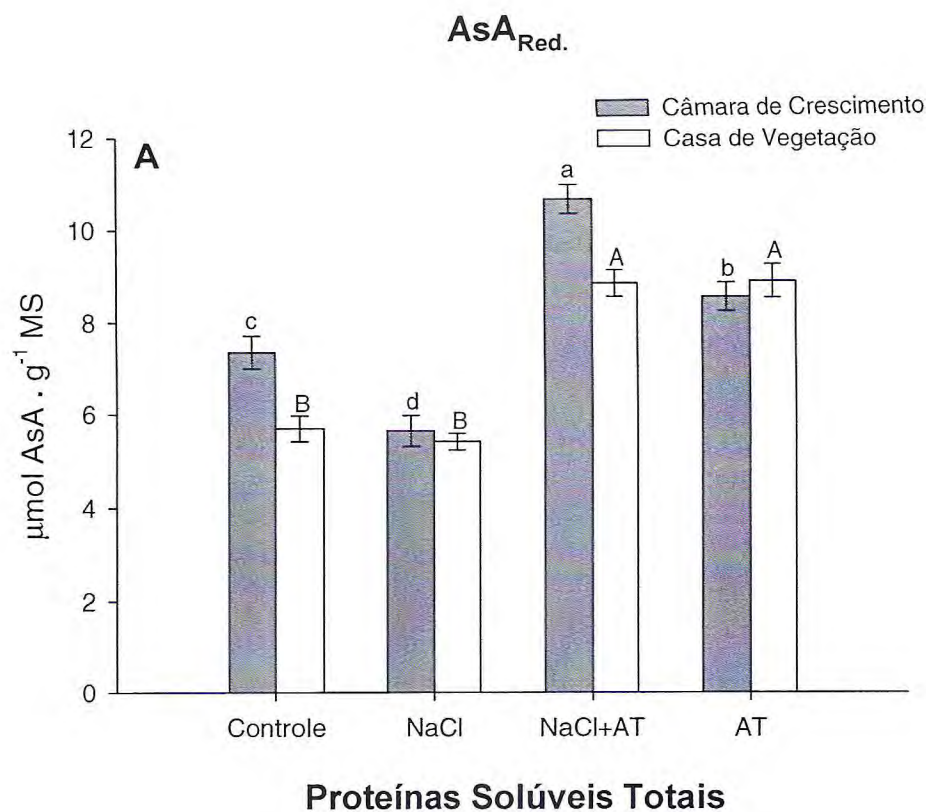


FIGURA 35 – (A) Conteúdo de Ascorbato Reduzido (AsA<sub>Red.</sub>) e (B) Proteínas Solúveis Totais de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (■) e de Casa de Vegetação (□), respectivamente. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas) ±Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). NaCl – NaCl 100 mM; NaCl+AT – NaCl 100 mM + 3-AT 10 mM; AT – 3-AT 10 mM. (Ver Estratégia Experimental).

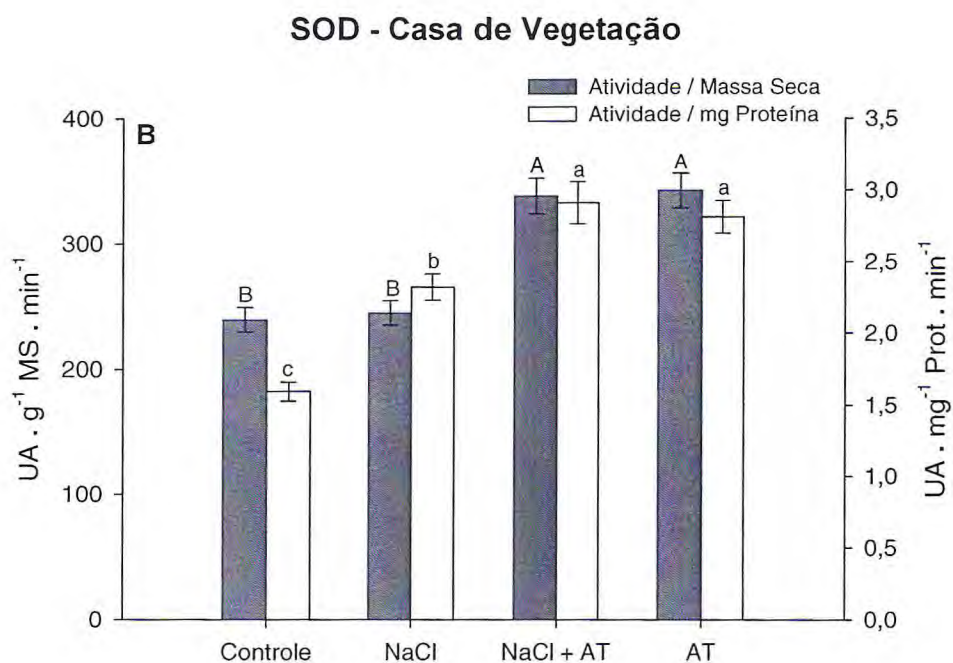
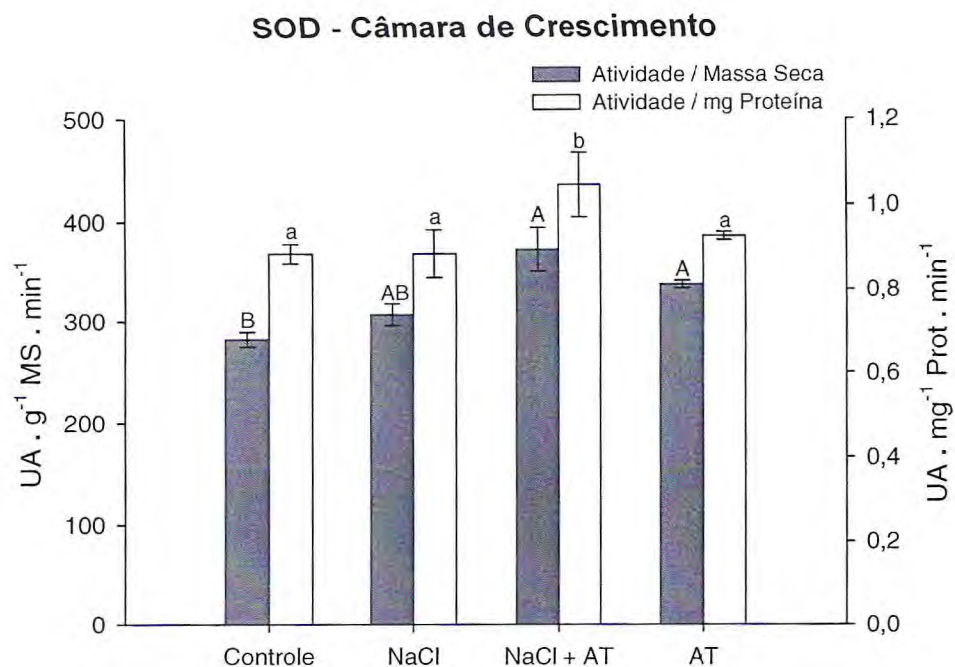
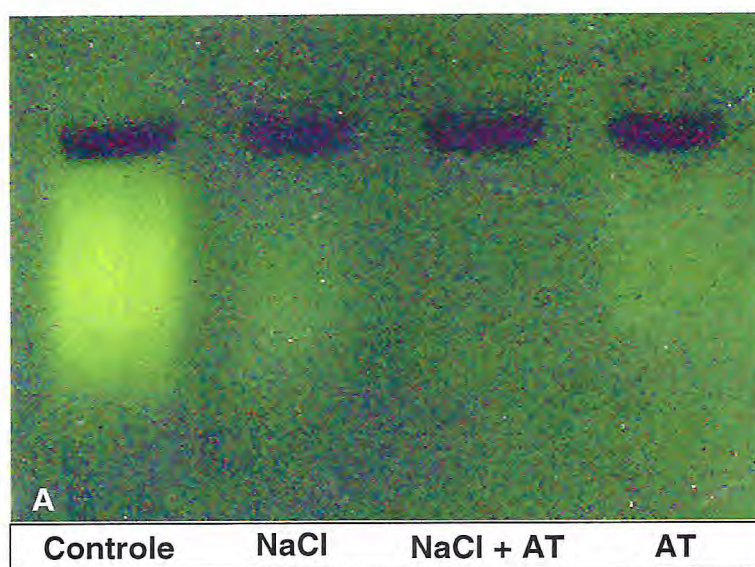


FIGURA 36 – Atividade Enzimática de Dismutases de Superóxido (SODs) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (A) e de Casa de Vegetação (B). Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). (Ver Estratégia Experimental).



## Câmara de Crescimento



## CAT

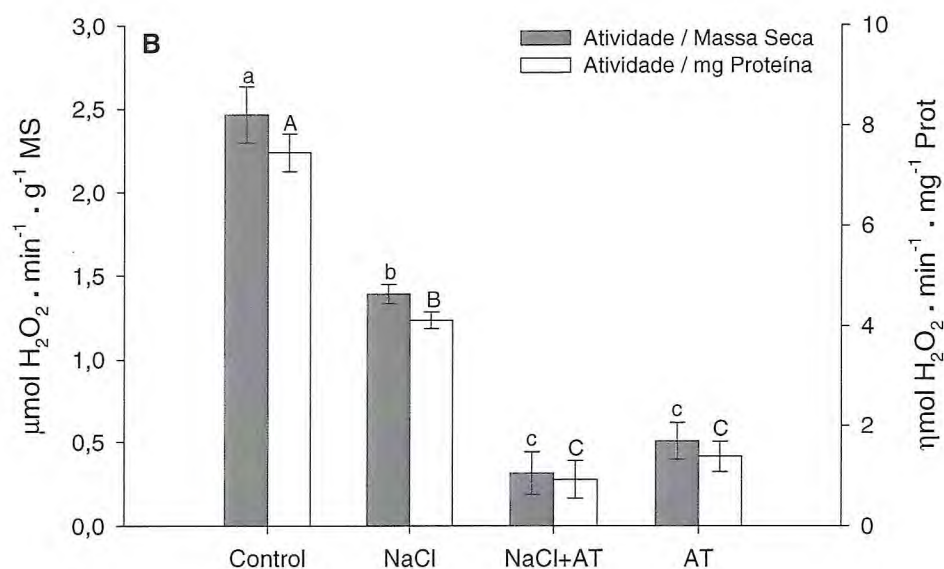


FIGURA 37 – Atividade Enzimática da Catalase (CAT) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento. (A) Atividade em Gel (Zimograma). (B) Atividade *in vitro*. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). (Ver Estratégia Experimental).

## Casa de Vegetação

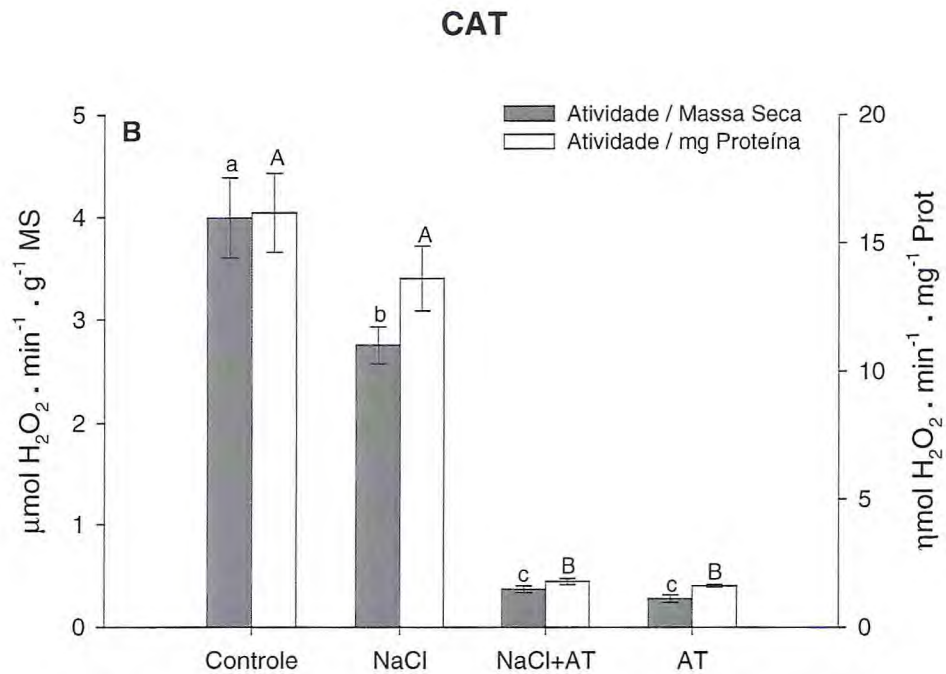
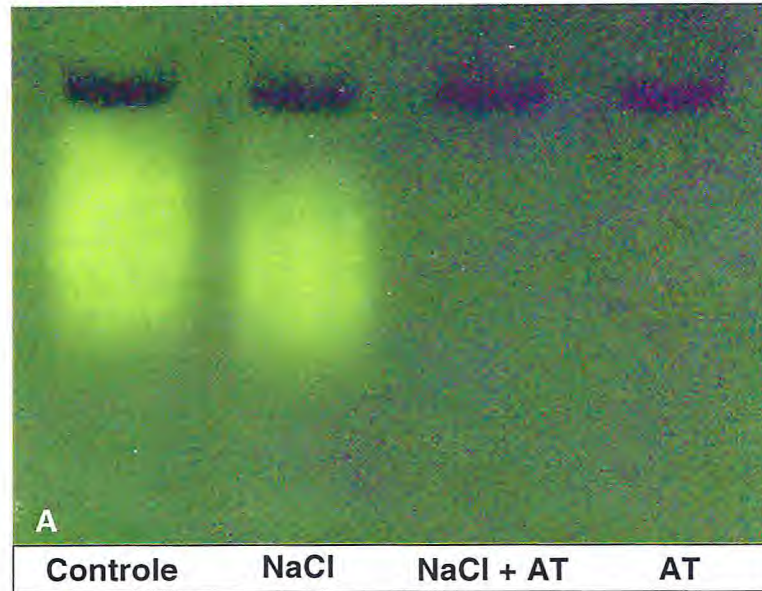
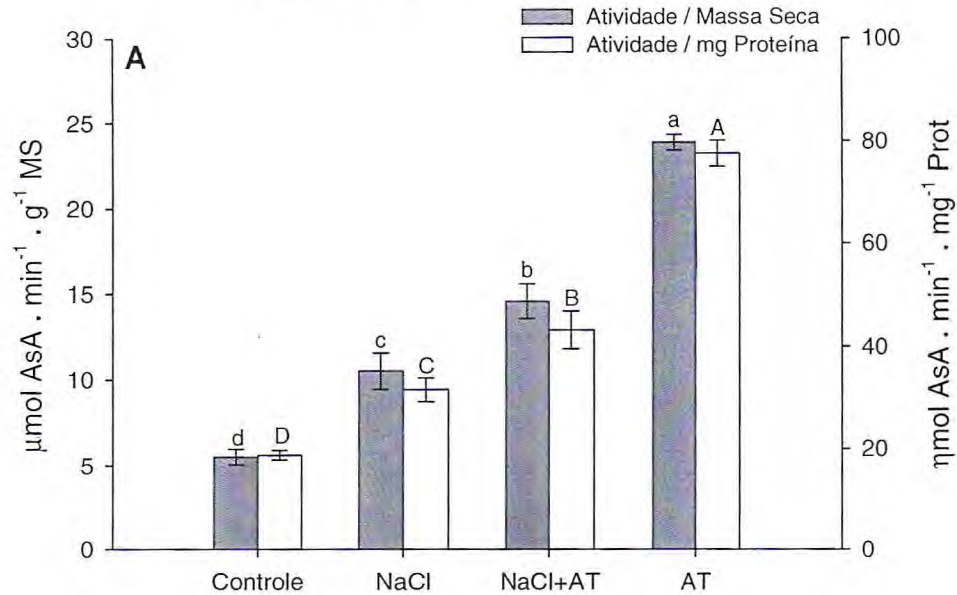


FIGURA 38 – Atividade Enzimática da Catalase (CAT) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Casa de Vegetação. (A) Atividade em Gel (Zimograma). (B) Atividade *in vitro*. Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$ Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). (Ver Estratégia Experimental).

### APX - Câmara de Crescimento



### APX - Casa de Vegetação

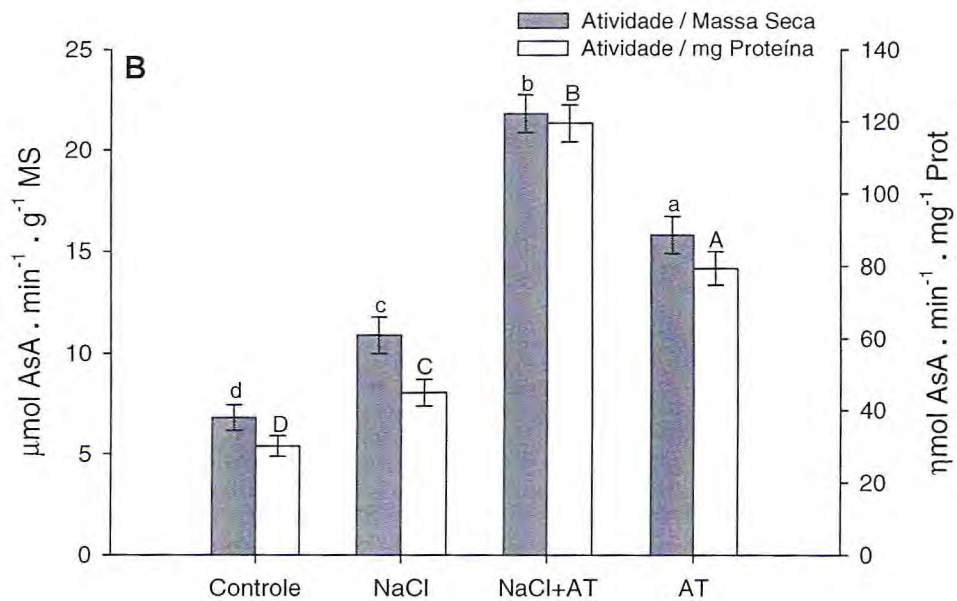


FIGURA 39 – Atividade Enzimática de Peroxidases de Ascorbato (APXs) de tecidos foliares de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento (A) e de Casa de Vegetação (B). Valores são médias de mensurações realizadas em 2 experimentos independentes em cada condição ambiental, com 4 e 3 repetições da parcela experimental (1 vaso com 2 plantas)  $\pm$  Desvio Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significantes nas médias pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ). (Ver Estratégia Experimental).

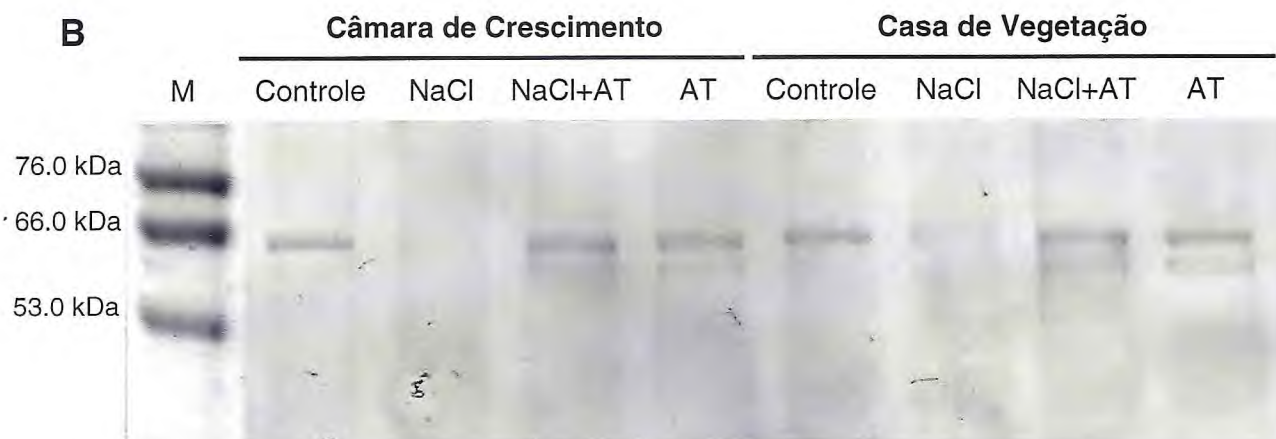
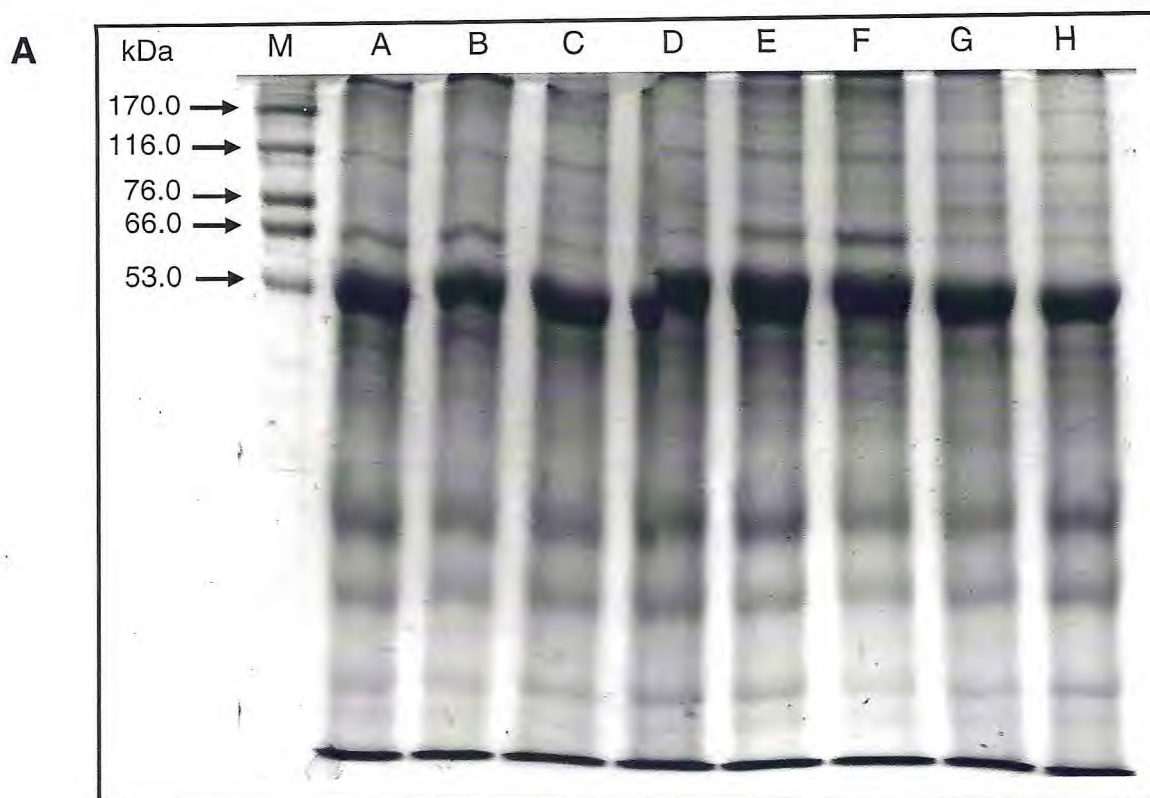


FIGURA 40 – (A) SDS-PAGE de proteínas de tecidos foliares de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de câmara de crescimento (poços A-D) e de Casa de Vegetação (poços E-H). M – Marcador de Peso Molecular. Foram aplicados 20  $\mu$ L do extrato de proteínas solúveis totais ( $\approx$ 40  $\mu$ g) por poço. Câmara de Crescimento: A – Amostras Controle; B – Amostras tratadas com NaCl 100 mM; C – Amostras tratadas com NaCl 100 mM e 3-AT 10 mM; D – Amostras apenas tratadas com 3-AT. Casa de Vegetação: E – Controle; F – NaCl 100 mM; G – NaCl 100 mM + 3-AT 10 mM; H – 3-AT. (B) Imunoblot de catalases, nas amostras acima relacionadas, utilizando o peptídeo sintético produzido a partir do alinhamento de seqüências primárias de CATs provenientes de outras espécies (Ver Estratégia Experimental).

### Câmara de Crescimento - *cat*

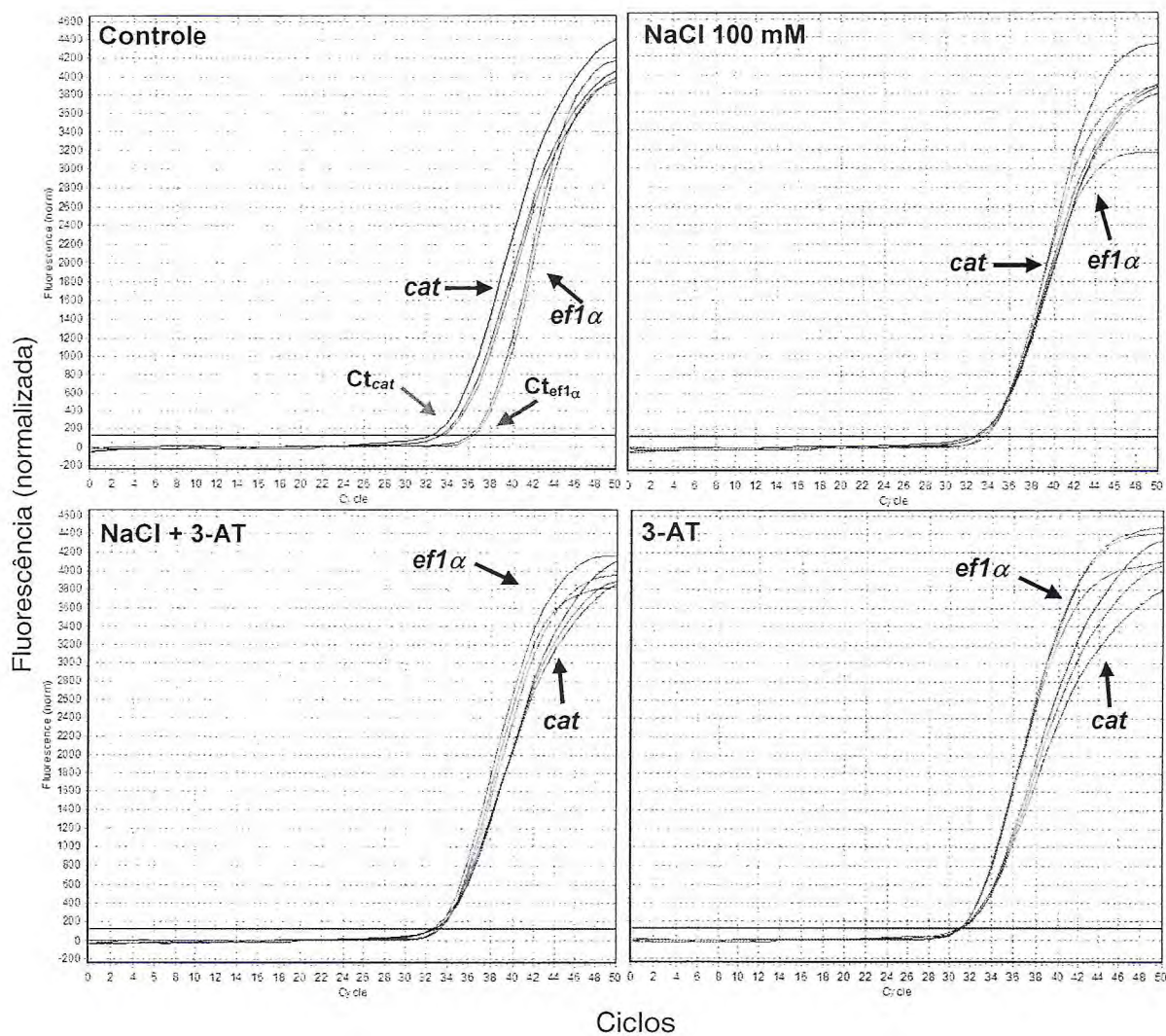


FIGURA 41 – (A) Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *cat* e *ef1α* (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao  $C_T$ . (Ver Estratégia Experimental).

Casa de Vegetação - *cat*

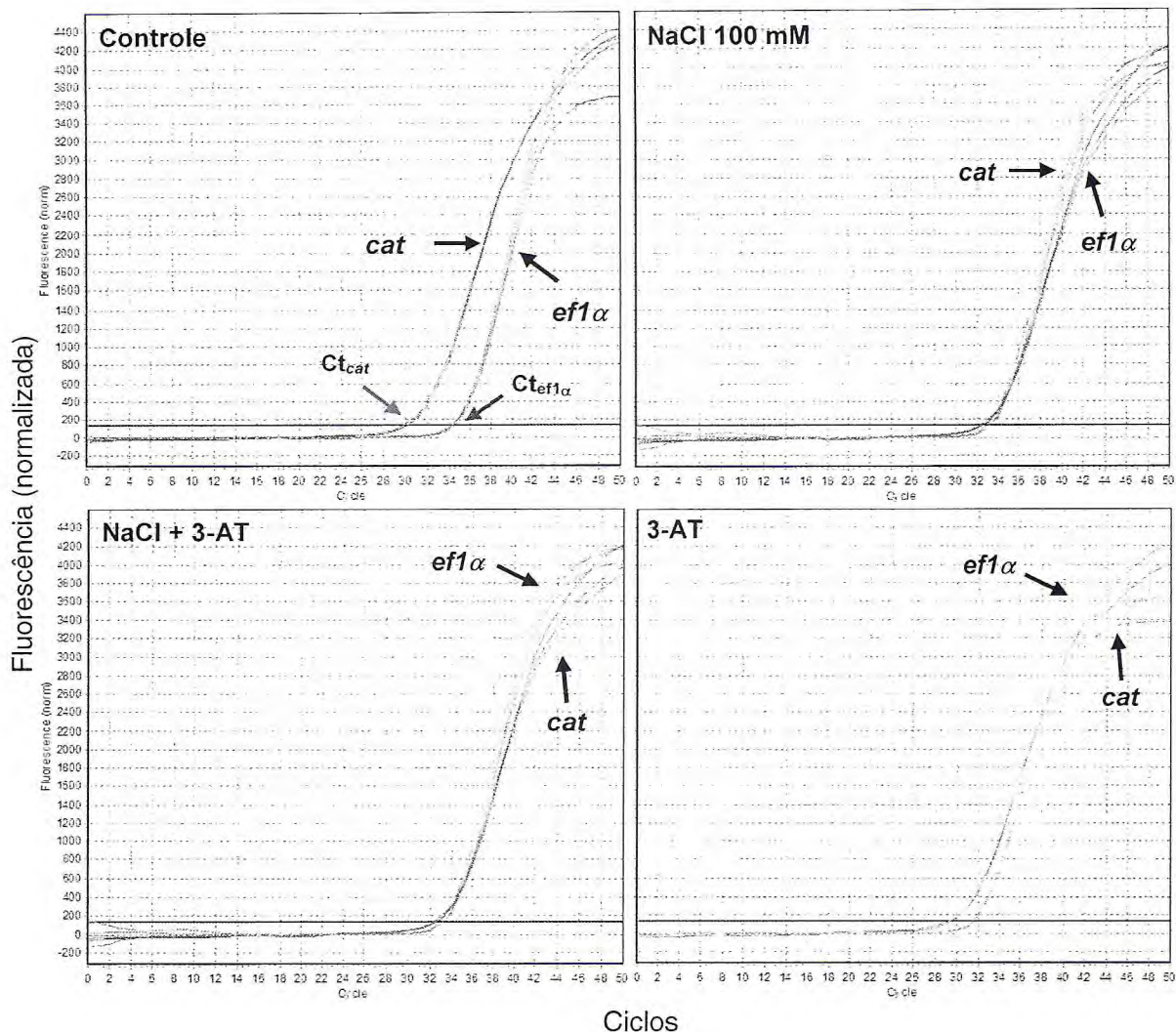


FIGURA 42 – Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *cat* e *ef1α* (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Casa de Vegetação. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao C<sub>T</sub>. (Ver Estratégia Experimental).

### Câmara de Crescimento - *cApx*

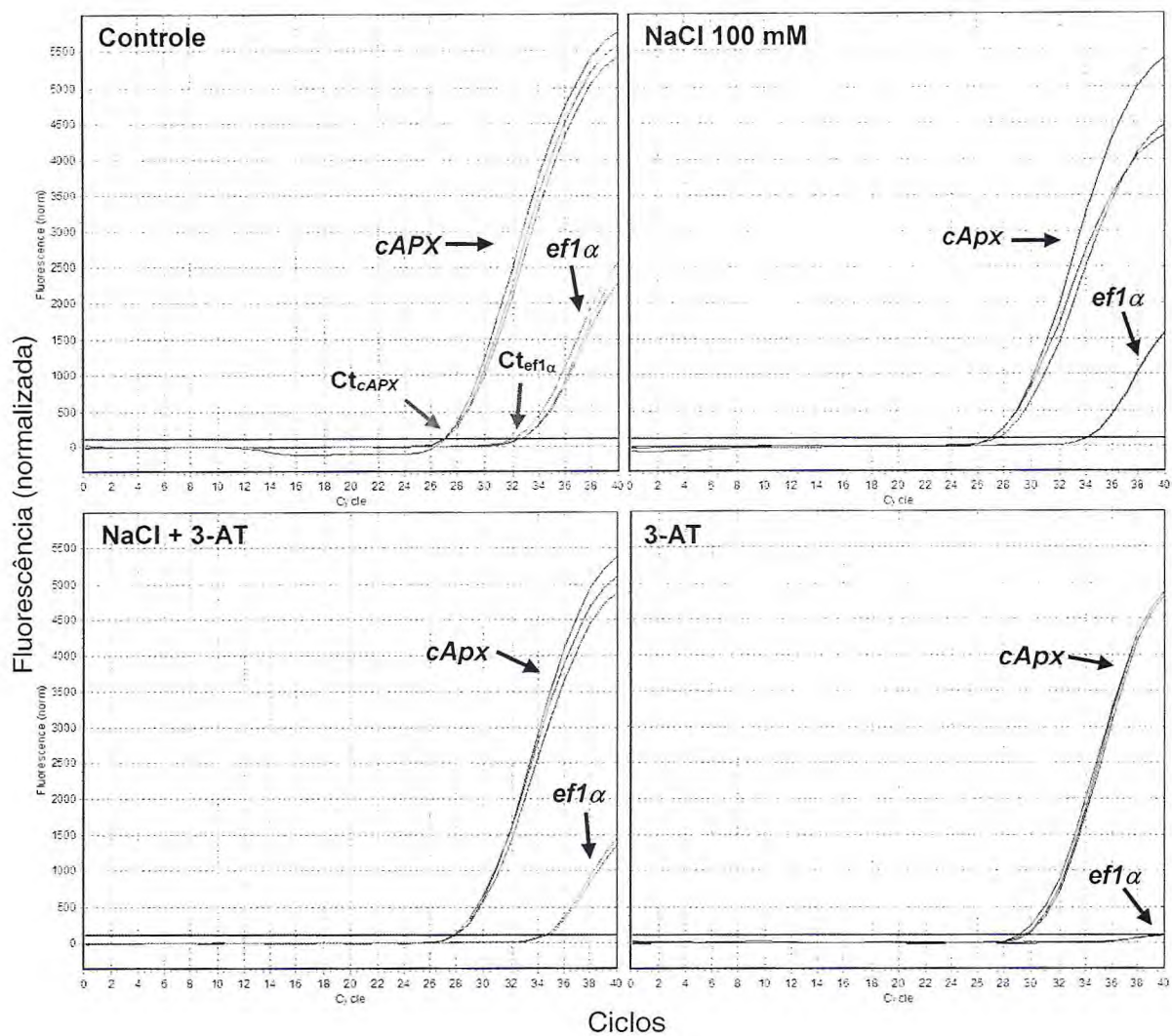


FIGURA 43 – (A) Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *cApx* e *ef1α* (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de Crescimento. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao  $C_T$ . (Ver Estratégia Experimental).

### Casa de Vegetação - *cApx*

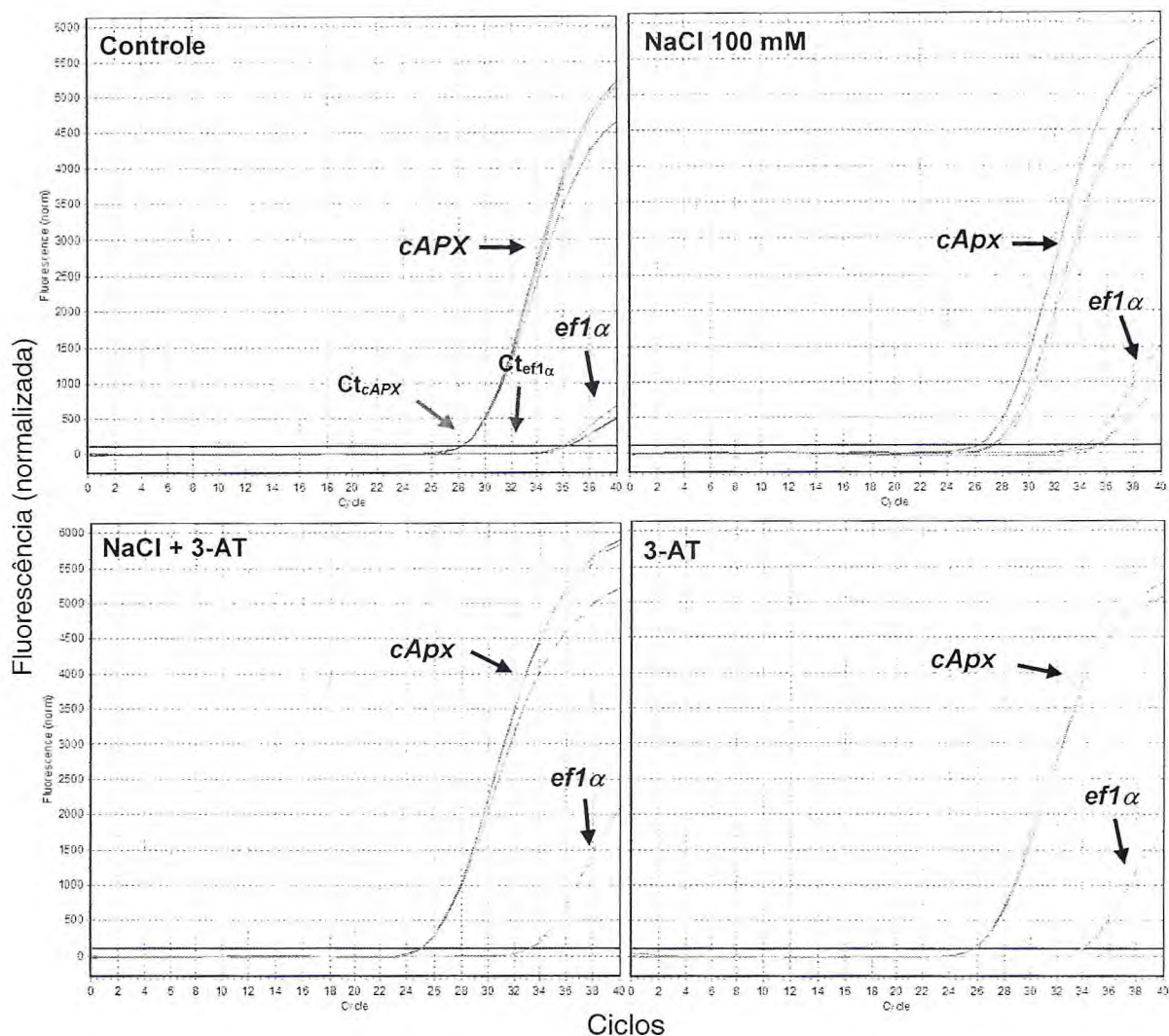
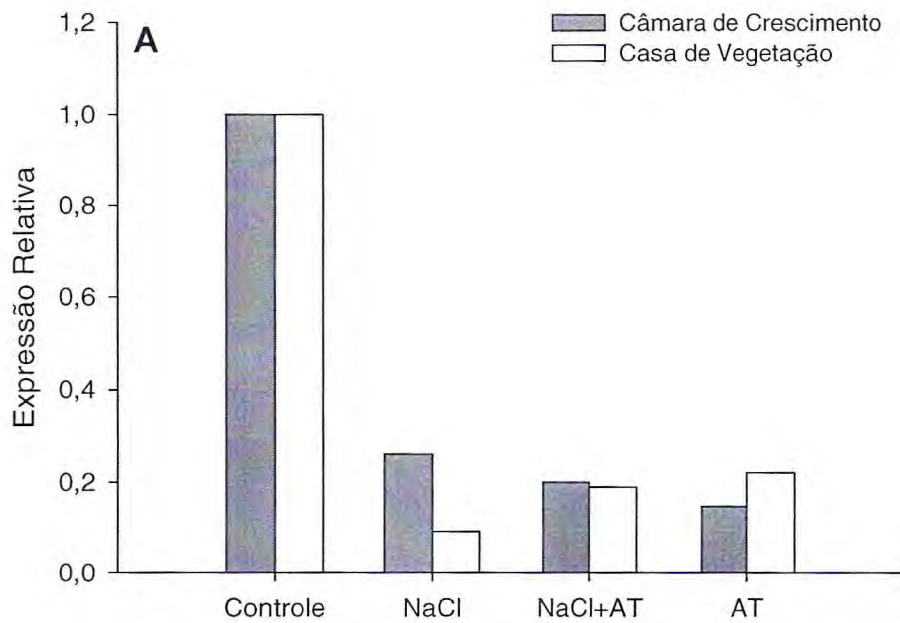


FIGURA 44 – Curvas de intensidade de fluorescência relativas à amplificação dos transcritos de *cApx* e *ef1α* (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Casa de Vegetação. Foram realizadas 3 repetições de cada amostra, com cada gene. A linha vermelha representa a intensidade relativa ao  $C_T$ . (Ver Estratégia Experimental).



### mRNA CAT



### mRNA cAPX

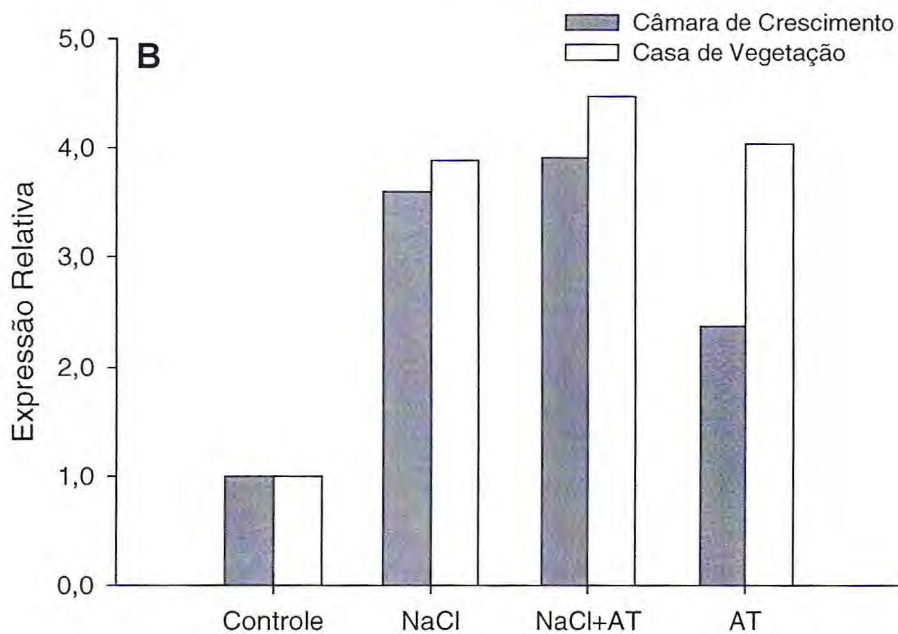


FIGURA 45 – Nível de expressão dos transcritos do gene para a enzima CAT (A) e para a enzima cAPX normalizados com o nível de expressão dos transcritos do gene constitutivo *ef1 $\alpha$*  (gene constitutivo), por RT-PCR quantitativo, a partir de mRNA extraído de folhas de plantas de *V. unguiculata*, cultivadas em condições de Câmara de crescimento (■) e de Casa de Vegetação (□), respectivamente. Cálculos realizados a partir do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , descrito por Livak & Schmittgen (2001).

## 8. DISCUSSÃO

### 8.1. Influência dos Estresses Hídrico e Salino nos Indicadores fisiológicos de Estresse de Plantas de *Vigna unguiculata*

No presente estudo, as plantas de feijão caupi cv. Pitiúba apresentaram estratégias fisiológicas comuns ante ao estresse osmótico induzido por PEG e por NaCl. A observada redução no crescimento, associada a uma queda na transpiração e a um aumento da resistência estomática (FIGURAS 10; 11; 32A e 33A e B) parecem ser as principais estratégias de plantas de feijão caupi para controlar a perda de água e prevenir grandes reduções no potencial hídrico durante situações de estresse osmótico. Estes processos são provavelmente as bases para a moderada resistência à seca que esta espécie apresenta. Estas reduções tanto na transpiração como no crescimento estão entre as primeiras respostas das plantas ao estresse osmótico (Chaves *et al.*, 2003) e foram relatadas para um grande número de espécies (Pimentel, 2004). A capacidade desta espécie de restringir a perda de água, em situações de estresse hídrico e salino, pode ser evidenciada pelos altos C.R.A e % de Umidade foliar (FIGURA 12; TABELAS 7 e 8), que tendem a permanecer sem grandes alterações.

De Carvalho *et al.* (1998) afirmaram que o fechamento estomático em plantas de *V. unguiculata* parece estar associado a algum sinal desencadeado pelo sistema radicular para a parte aérea, durante situações de deficiência de água, e parece independente do *status* hídrico das folhas. Essa comunicação entre os dois órgãos foi relatada em outras espécies (Passioura, 2002) e o ácido abscísico (ABA) está provavelmente envolvido na mediação destas respostas estomáticas (Sharp & Lenoble, 2002; Reddy *et al.*, 2004). Assim, parâmetros como o C.R.A. e o % Umidade não podem ser utilizados como únicos indicadores de estresse hídrico em *V. unguiculata* (de Carvalho *et al.*, 1998), pois esta espécie consegue manter uma alta hidratação em seus tecidos, impedindo assim parte dos danos metabólicos. Esta regulação precoce do fechamento estomático é uma clara estratégia de escape à seca, associada a uma resistência sob alto conteúdo de água, utilizada por esta espécie para impedir danos metabólicos diretos (Levitt, 1980).

Um outro fator a ser notado, é a influência exercida pela condição ambiental. O ambiente de casa de vegetação induziu grandes modificações no indicador fisiológico de C.R.A., em todos os experimentos realizados. Uma influência do ambiente também foi visualizada no %Umidade, apenas no Experimento III. Este contraste provavelmente se deve a diferenças climáticas associadas ao mês em que os experimentos foram realizados. Na casa de vegetação, além do estresse osmótico moderado as plantas foram submetidas a

condições de altas temperaturas e baixa umidade relativa do ar. A combinação entre um estresse hídrico e alta temperatura é comumente encontrada em regiões semi-áridas, e tem um efeito ainda mais prejudicial ao crescimento das plantas do que cada um destes estresses aplicados individualmente (Rizhsky *et al.*, 2004). E isto foi claramente observado no Experimento I, no qual a diminuição no crescimento das plantas tratadas com PEG foi evidenciada com apenas 24 h após a aplicação do estresse na casa de vegetação, enquanto que na câmara de crescimento a diferença no crescimento só foi observada após 48 h.

O decréscimo nos valores de  $\Psi_s$  observados neste estudo (FIGURA 13 e TABELA 7 e 8) nas plantas de feijão caupi submetidas ao estresse hídrico induzido por PEG ou NaCl é semelhante aos relatados por Campos *et al.* (1999). O estresse osmótico induz uma perda na pressão de turgescência celular, promovendo uma série de distúrbios metabólicos (Chaves *et al.*, 2003). Para manter a turgescência, os tecidos devem manter um baixo  $\Psi_s$ , geralmente por um aumento na concentração de solutos dentro da célula, mantendo assim a absorção de água, em um processo chamado de ajustamento osmótico (AO). Campos *et al.* (1999) e Sousa *et al.* (2004) relataram aumentos no conteúdo de prolina e de açúcares solúveis totais em plantas de *V. unguiculata* sob condições de estresse hídrico. No entanto, esta acumulação parecia estar mais relacionada a uma consequência do estresse, do que um AO em si. Mesmo com os altos C.R.A. e % Umidade, os dados apresentados neste estudo não apresentam evidências que levam a concluir que a diminuição dos valores de  $\Psi_s$  está verdadeiramente ligada ao AO ou se é um resultado do aumento da concentração da seiva celular devido à desidratação do tecido. A semelhança entre os valores obtidos de  $\Psi_s$  nos tratamentos de NaCl e de PEG, reforçam a afirmação de Cavalcanti *et al.* (2004) de que as estratégias fisiológicas do feijão caupi sob condições de estresse hídrico e salino são semelhantes.

O tempo de tratamento de 72 h foi o suficiente para que o tratamento com sal exercesse um efeito iônico nos tecidos foliares, como pode ser observado na FIGURA 33C. Os níveis de concentração atingiram níveis da ordem de 1500 mmol de  $\text{Na}^+$  .  $\text{kg}^{-1}$ , considerado tóxicos aos processos bioquímicos e a muitas das enzimas presentes no citossol (Tester & Davenport, 2003; Munns, 2005). Cavalcanti *et al.* (2004; 2007) em seus experimentos verificaram que as concentrações de  $\text{Na}^+$  nos tecidos foliares de feijão caupi alcançaram valores aproximados de 50 mmol  $\text{Na}^+$  .  $\text{kg}^{-1}$  MS, em exposição ao NaCl na concentração de 200 mM, durante 6 dias. Embora a dose de sal e o tempo de exposição tenham sido maiores do que os utilizados no presente estudo, estes autores utilizaram areia como substrato. O cultivo em solução nutritiva expõe as raízes da planta diretamente ao sal, o que pode alterar suas capacidades de controle da entrada e exclusão dos íons  $\text{Na}^+$ . No entanto, as folhas das plantas de feijão caupi, não apresentaram sintomas de toxicidade

devido ao excesso de sal. Segundo Munns (2002), os danos provocados pelo sal são devidos a acumulação excessiva dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nas folhas que estão transpirando, excedendo a habilidade das células de compartimentalizar estes íons nos vacúolos. Então é provável que uma parte do  $\text{Na}^+$  esteja neste compartimento, e apenas uma menor fração deste íon esteja presente no citoplasma.

## **8.2. Efeitos tempo-dependente do PEG sobre o sistema antioxidante de tecidos foliares**

De Carvalho *et al.* (1998) e Souza *et al.* (2004) relataram que o fechamento estomático em plantas de *V. unguiculata*, submetidas ao estresse hídrico, induziu um decréscimo nas taxas de assimilação de  $\text{CO}_2$ , devido a uma diminuição na  $C_i$ . Isto irá ocasionar um menor consumo do poder redutor e da energia química produzida pelos fotossistemas, causando uma super-redução das cadeias de transporte de elétrons. Além disso, o fechamento estomático causa também um decréscimo na relação  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  levando também a um aumento do processo de fotorrespiração (Wingler *et al.*, 2000). Os elétrons em excesso podem então ser transferidos para o oxigênio, elevando a produção de AOS. É amplamente aceito que esta superprodução de AOS nos cloroplastos é a principal causa de danos oxidativos nas folhas (Foyer & Noctor 2003; Cavalcanti *et al.*, 2007). Este aumento nas AOS pode ter contribuído ativamente para a peroxidação dos lipídeos de membrana, como indicado pelo aumento no nível de TBARS (FIGURA 14A e C).

A exposição de plantas de feijão caupi ao estresse hídrico moderado, em condições naturais de temperatura e luminosidade, induziu uma extrema excitação dos sistemas fotoquímicos, aumentando ainda mais os riscos da geração de AOS (Souza *et al.*, 2004). De fato, além dos níveis de peroxidação de lipídeos, as atividades enzimáticas de SOD, APX e CAT nas plantas tratadas com PEG submetidas às condições da casa de vegetação foram bem maiores do que os observados para as plantas tratadas sob condições controladas. Ou seja, no caso do Experimento I, além do efeito no crescimento, a condição ambiental também exerceu influência nos indicadores relacionados aos danos oxidativos. Isto pode, portanto, ser uma consequência da interação entre diferentes fatores de estresse que ocorreu neste ambiente, induzindo ainda mais o processo de fotorrespiração (Noctor *et al.*, 2002).

O ascorbato é o antioxidante solúvel mais abundante nos cloroplastos e está envolvido na fotoproteção e na eliminação de AOS durante o processo de fotossíntese (Noctor & Foyer, 1998; Smirnov, 2000a; 2000b). Sob condições de estresse foto-oxidativo a biossíntese desta molécula é induzida para aumentar o seu conteúdo e proteger os

cloroplastos dos danos causados pelo excesso de AOS (Asada, 1999). O ascorbato atua basicamente em 3 modos: como antioxidante removendo o  $H_2O_2$  formado pela fotoredução do oxigênio no PSI (Reação de Mehler), atuando diretamente ou indiretamente, doador de elétrons para a APX; o Monodehidroascorbato (MDHA), produto da reação da APX pode agir como um acceptor direto do excesso de elétrons no PSI; e por último ele supre elétrons para a enzima violaxantina de-epoxidase (VDE), uma enzima ligada à membrana do tilacóide, que sintetiza a Zeaxantina, composto responsável pela dissipação do excesso da energia de excitação na forma de calor, em condições de estresses abióticos que limitam a fixação do  $CO_2$  (Smirnoff, 1996; 2000a).

Os maiores valores no conteúdo de  $AsA_{Red}$ , observados nas plantas tratadas com PEG podem estar associados à proteção dos cloroplastos contra um provável excesso de AOS (FIGURAS 14B e D). Nas plantas tratadas, cultivadas na casa de vegetação, este aumento foi linear com o tempo de exposição, indicando uma provável relação entre o conteúdo de ascorbato e a proteção contra danos ao fotossistema, induzidos por altas taxa de luminosidade e diminuição nas taxas de assimilação de  $CO_2$ . Souza *et al.* (2004) verificaram que a partir do 3º dia após a suspensão da irrigação há significantes aumentos no *quenching* não-fotoquímico, o que poderia indicar a ocorrência de mecanismos não-radiativos de dissipação de energia, no qual uma maior quantidade dos fótons absorvidos é perdida como energia térmica ao invés de serem utilizados para a fotossíntese. Como a Zeaxantina desempenha um papel crucial nesta dissipação, a maior quantidade de  $AsA$ , nas plantas estressadas, pode também estar relacionada à biossíntese desta molécula (Smirnoff, 1996; Noctor & Foyer, 1998).

Shalata & Neumann (2001) relataram que a aplicação exógena de ascorbato em plantas de tomate submetidas a estresse salino proporcionou significantes reduções nos níveis de peroxidação de lipídeos. O maior conteúdo de  $AsA_{Red}$ , nas plantas tratadas, não proporcionou uma diminuição no nível de peroxidação de lipídeos, em nenhuma das condições testadas. É possível que o aumento observado no indicador de TBARS tenha ocorrido principalmente na plasmalema, devido à fuga das AOS produzidas em excesso nos peroxissomos, como conseqüência do processo de fotorrespiração e por uma redução da atividade de CAT (FIGURA 18), como proposto por Cavalcanti *et al.* (2007). Enquanto que a proteção proporcionada pelo ascorbato estaria mais restrita aos cloroplastos, na proteção do aparato fotossintético. Relatos de aumentos no conteúdo de  $AsA$  na forma reduzida são comuns em plantas com baixa atividade de CAT, expostas a condições de fotorrespiração (Noctor *et al.*, 2002). É importante ressaltar ainda, que o aumento do conteúdo de  $AsA_{Red}$  pode ter sido originado a partir de uma indução na sua biossíntese, como também de uma intensa atividade dos sistemas enzimáticos para a sua recuperação na forma reduzida

(*turnover* mais rápido), ou por ambos. Entretanto, os resultados apresentados neste estudo não permitem a conclusão de qual destas duas possibilidades melhor explicaria o que foi observado.

A enzima SOD tem um papel crucial na proteção do cloroplasto contra os radicais  $O_2^{\bullet-}$  produzidos no PSI, durante o ciclo Mehler-peroxidase nos cloroplastos (Asada, 1999; Apel & Hirt, 2004). Foi mostrado que os fosfolipídeos da membrana são impermeáveis ao radical superóxido, sendo provavelmente um dos principais motivos da presença da SOD em praticamente todos os compartimentos subcelulares (Alscher *et al.*, 2002). A atividade desta enzima apresentou comportamentos contrastantes entre os 2 ambientes testados (FIGURA 16). O aumento na atividade observado nas plantas tratadas com PEG sob condições controladas pode ter sido consequência do aumento na produção do radical  $O_2^{\bullet-}$  tanto nos cloroplastos, como no citossol. A maior parte desta atividade provavelmente é proveniente das Cu-Zn SODs, basicamente por 2 motivos: primeiro porque elas são as isoformas de SOD mais abundantes nas células (Alscher *et al.*, 2002); segundo, são as principais isoformas presente no citossol, e a extração realizada no presente estudo apesar de representar uma fração celular total, é mais rica em proteínas solúveis do citoplasma.

Levando-se em conta, os fatores apontados acima, era de se esperar uma diminuição da atividade de SOD nas plantas tratadas com PEG nas condições de casa de vegetação. Neste ambiente, a interação entre o estresse hídrico aplicado junto com altas temperaturas e luminosidade favorece ainda mais o processo de fotorrespiração e a geração de  $H_2O_2$  nos peroxissomos. Esta AOS é eliminada nestas organelas pela enzima CAT, que no presente estudo, apresentou uma abrupta diminuição na sua atividade (FIGURA 18D). Como as membranas das organelas apresentam significativa permeabilidade ao  $H_2O_2$  (Bienert *et al.*, 2006), é bem plausível que esta AOS migrou para o citossol para ser eliminada pela APX citossólica (Davletova *et al.*, 2005), provocando aumentos transientes na  $[H_2O_2]$  neste compartimento. É amplamente conhecido o fato de que esta AOS inibe a atividade das Cu-Zn SODs (Kliebenstein *et al.*, 1998; Alscher *et al.*, 2002). Portanto, a redução da atividade de SOD observada nas referidas condições, pode ter sido associada a uma alta do processo de fotorrespiração.

Pnueli *et al.* (2003) e Davletova *et al.* (2005) afirmaram que a enzima APX citossólica exerce um papel central para a proteção dos cloroplastos e mitocôndrias durante situações de estresse abiótico. Esta enzima poderia ainda atuar na eliminação do excesso de  $H_2O_2$  proveniente dos peroxissomos durante o processo de fotorrespiração. De fato, um aumento na atividade total de APX foi observado a partir de 48 h nas plantas tratadas com PEG, nas condições de casa de vegetação (FIGURA 17D) em paralelo com uma diminuição na atividade de CAT (FIGURA 18D). No entanto, o aumento da atividade de APX não foi

suficiente para diminuir os danos oxidativos nas membranas. Esta constatação está de acordo com as observações de Willenkens *et al.* (1997) e de Rizhsky *et al.* (2002), de que quando há uma ausência ou diminuição da atividade de CAT os sistemas antioxidantes das células entram em colapso.

### **8.3. Efeitos da ausência do sistema antioxidante enzimático da CAT induzido pela aplicação do 3-AT**

O presente estudo mostrou que a aplicação do composto 3-AT induziu a morte celular em tecidos foliares de plantas de feijão caupi, cultivadas em condições de câmara de crescimento e de casa de vegetação. Uma das principais características deste composto é a sua capacidade de inibir a atividade *in vivo* e *in vitro* da enzima catalase (Havir, 1992). A ausência desta enzima leva a um sério comprometimento no metabolismo antioxidante, levando a uma maior acumulação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos tecidos, geralmente associada com a indução do processo de morte celular programada (PCD) (Zámocky & Koller, 1999; Dat *et al.*, 2000; Gechev *et al.*, 2002; Dat *et al.*, 2003; Gechev *et al.*, 2005; Gechev & Hille, 2005).

Como ressaltado anteriormente, a inibição da catalase pelo 3-AT é irreversível, realizada por meio de ligação covalente (Zámocky & Koller, 1999). Apesar de estudos conclusivos não terem sido realizados com catalases de origem vegetal, sabe-se que a partir de estudos com catalases de fígado bovino, que para esta inibição ocorrer é necessário que a molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> esteja ligada ao grupo heme da proteína. No entanto, o 3-AT se liga a porção protéica, diretamente em um resíduo de histidina 74 (Margoliash & Novogrodsky, 1958; Margoliash *et al.*, 1960). Dados recentes de difração de raios-X em cristais de uma catalase de *Penicillium vitale* ligadas ao AT, confirmaram a ligação a este resíduo (Zámocky & Koller, 1999). Acredita-se que o mesmo tipo de ligação ocorra em catalases de plantas, pois estas apresentam 38% de similaridade com as seqüências de aminoácidos da catalase de fígado, e tende a ser maior nas regiões importantes para a atividade catalítica (Havir, 1992).

Os sintomas apresentados pelas folhas de feijão caupi, submetidas a várias aplicações do composto 3-AT (FIGURAS 9 e 32B e C) foram similares aos relatados por Gechev *et al.* (2002; 2005), em plantas de fumo e em *Arabidopsis*. A clorose e as lesões de necrose observadas nos presentes experimentos foram também extremamente semelhantes às encontradas em plantas de fumo transformadas com gene antisense da catalase (*cat-1*) (Willenkens *et al.*, 1997) e em plantas de *Arabidopsis* com o gene antisense de *cat-2*, uma catalase associada com a eliminação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido durante o processo de fotorrespiração (Vandenabeele *et al.*, 2004). No entanto, uma grande vantagem da aplicação

do 3-AT sobre a abordagem de silenciamento de genes é a simplicidade de sua aplicação e a velocidade com que o efeito final da ausência de catalase é alcançado, pois a obtenção de plantas transgênicas é um processo lento, e em alguns casos inviável (Gechev *et al.*, 2005).

As plantas tratadas com o 3-AT, tanto na presença ou ausência do estresse osmótico induzido por PEG ou NaCl, apresentaram uma redução abrupta na atividade de catalase, que é um dos efeitos esperados deste inibidor. Embora tanto os estresses com PEG e 3-AT isolados tenham apresentado uma indução na peroxidação de lipídeos nos nossos experimentos, o aumento mais significativo ( $P < 0,05$ ) foi causado pela combinação do 3-AT com um estresse osmótico (FIGURAS 20A e 34A). De fato, os sintomas das plantas tratadas com PEG+AT e NaCl+AT foram bem mais severos, principalmente no ambiente de casa de vegetação, onde as condições de alta luminosidade e temperaturas, típicas do semi-árido nordestino, constituem-se em um sério agravante a estes estresses. Este aumento no TBARS mediante tratamento com 3-AT também foi observado em outros estudos (Gechev *et al.*, 2002).

É interessante notar, no entanto, que os sintomas de necrose observados nas folhas de feijão caupi tratadas com 3-AT foram acompanhados por um aumento no conteúdo de  $H_2O_2$ , apenas nas plantas cultivadas no ambiente de casa de vegetação, e não nas cultivadas em condições controladas (FIGURAS 20B e 34B). De fato, nestas últimas, os sintomas da aplicação do inibidor não foram tão exacerbados como foram nas condições de casa de vegetação. Isto é corroborado pela observação realizada por Willenkens *et al.* (1997) de que plantas transgênicas deficientes no gene da *cat1* só apresentam lesões de necrose nas folhas e inibição da fotossíntese quando submetidas a condições que favorecem as altas taxas de fotorrespiração, como baixo  $CO_2$ , altas luminosidade e temperaturas. A administração de 3-AT a plântulas de ervilha via corrente transpiratória causou um aumento no conteúdo de  $H_2O_2$  apenas nestas condições, e não em condições ambientais ideais (Amory *et al.*, 1992).

Sendo o caupi uma espécie de metabolismo  $C_3$ , e nas condições da casa de vegetação há um significativo aumento do processo de fotorrespiração, a ausência da atividade da CAT parece realmente estar mais associada à eliminação do  $H_2O_2$  produzido como consequência deste processo, como levantado por Foyer & Noctor (2000) e Noctor *et al.* (2002). Isto sugere também que outros sistemas antioxidantes podem ter tido um papel central no controle da acumulação do  $H_2O_2$ , nas condições de câmara de crescimento, como também foi sugerido por Amory *et al.* (1992). E pelos resultados aqui apresentados, os significantes aumentos no conteúdo de AOS apresenta um relação com os aumentos nos indicadores de TBARS (FIGURAS 20 e 34). Os valores obtidos de  $H_2O_2$  no presente trabalho estão condizentes com os encontrados em tecidos foliares de outras espécies vegetais por Veljovic-Jovanovic *et al.* (2002), Luna *et al.* (2005) e Cheeseman *et al.* (2006).



Os níveis de atividade de CAT nas plantas da casa de vegetação se apresentaram cerca de 4 vezes menores do que os níveis observados para as plantas controle e tratadas com PEG, mostrando que a condição ambiental exerceu um efeito significativo na atividade desta enzima, embora tal efeito não tenha sido observado no Experimento III. Neste, uma queda na atividade de CAT não foi observada nas plantas tratadas com NaCl. De forma inesperada, não houve reconhecimento aparente de nenhuma isoforma de CAT, no imunoblot realizado com as amostras de proteínas das plantas submetidas a este tratamento específico (FIGURA 40B). Este mesmo efeito não foi observado nas plantas tratadas com PEG (FIGURA 26B). Schmidt *et al.* (2006) afirmaram que apesar de ser uma enzima de crucial importância para as plantas C<sub>3</sub> em condições de alta radiação luminosa e altas temperaturas, a maioria das isoformas de CATs são sensíveis a luz, e a sua fotoinativação ocorre mesmo em folhas intactas e não estressadas. Esta inativação parece ser compensada por uma alta e constante taxa de síntese *de novo* (Hertwig *et al.*, 1992). Talvez estes sejam os motivos pelos quais as plantas submetidas à casa de vegetação tenham se mostrado mais sensíveis a aplicação dos tratamentos de estresse. No entanto, no presente experimento, foi observada uma forte repressão nos níveis de mRNA para a enzima CAT (FIGURAS 31A e 45A).

A proeminente queda no nível de mRNA para a CAT nos tratamentos com 3-AT foi também relatada por Gechev *et al.* (2005). Portanto, os resultados encontrados neste estudo sugerem que este composto, além de inibir a atividade das catalases *in vitro* e *in vivo*, tem também uma pronunciada ação na expressão dos mRNAs para esta proteína. Entretanto, com bases em nossos resultados, não podemos afirmar se esta ação é direta, em uma regulação específica, ou indireta, devido a uma maior acumulação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que levaria a uma série de eventos de sinalização que culminariam na indução ou repressão de diversos genes. Schmidt *et al.* (2006) relatou que a presença de 3-AT induziu uma maior eficiência na tradução *in vitro* do mRNA de CAT em plantas de centeio. No entanto, estes autores trabalharam com modelos baseados em órgãos isolados, e não modelos de planta inteira, além de utilizarem doses de 2 mM de 3-AT, suplantadas no meio onde os segmentos eram cultivados.

No presente estudo, a análise de imunoblot, com anticorpos produzidos contra um peptídeo sintético de CAT, revelou a presença de apenas uma banda nas amostras do Experimento II (FIGURA 26B) e duas bandas, apenas na combinação de NaCl+AT (FIGURA 40B), diferentemente das 3 que são normalmente encontradas nas folhas de plantas superiores (McCLung, 1997; Polidoros & Scandalios, 1997). Havir & McHale (1987) afirmaram que as folhas de *Phaseolus vulgaris*, uma espécie da mesma subtribo de *Vigna unguiculata*, parecem ter apenas uma única isoforma de CAT. Os mesmos autores

reportaram que uma completa inibição da atividade de CAT por 3-AT raramente é alcançada, e estes identificaram que a CAT-3 de milho é menos sensível a este inibidor, pois apresenta também uma atividade do tipo peroxidásica (Havir, 1992). Mesmo com a acentuada queda nos níveis do mRNA para CAT, houve o reconhecimento de uma isoforma que aparentemente apresenta incipientes variações entre os diversos tratamentos, e uma outra isoforma induzida apenas pelo tratamento combinado NaCl+AT. Embora os resultados aqui apresentados não permitam conclusões definitivas, algumas hipóteses podem ser levantadas: a isoforma reconhecida pode ter uma menor sensibilidade ao 3-AT ou a expressão do seu mRNA é constante e independente da sinalização desencadeada pelo aumento do conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular.

Em contraste com a redução na atividade e no nível de mRNA de CAT observados, a atividade de APX foi significativamente induzida nas plantas estressadas cultivadas na câmara de crescimento (FIGURA 25A e 45A). Esta indução na APX foi acompanhada por um significativo aumento no conteúdo de AsA<sub>Red</sub> (FIGURA 21A e 35A) em ambos os experimentos. Rizhsky *et al.* (2002) relataram que plantas transgênicas com ausência da expressão da CAT tiveram significantes aumentos, da ordem de 250% do controle, na expressão da enzima Monodehidroascorbato redutase (MDHAR). Esta enzima exerce um papel fundamental na rápida regeneração do AsA<sub>Red</sub>, a partir de monodehidroascorbato (MDHA), produto da reação da APX, utilizando o NADPH como doador de elétrons. Além da possibilidade de ser novamente utilizado pela APX para eliminar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o AsA<sub>Red</sub> também pode reagir não enzimaticamente com esta AOS, produzindo também MDHA (Noctor & Foyer, 1998). O tratamento com 3-AT em plantas de *Arabidopsis* também elevou, em mais de 12 vezes, o nível do mRNA para a MDHAR, mostrando que esta enzima tem um papel crucial na manutenção do AsA<sub>Red</sub> para a enzima APX, em condições de ausência ou atividade diminuída da enzima CAT (Gechev *et al.*, 2005). Além disso, uma série de estudos tem relatado que uma atividade reduzida de CAT, seja pela aplicação do 3-AT, seja por silenciamento gênico, induz a produção de Glutathione, um importante antioxidante não-enzimático (Smith, 1985; Willenkens *et al.*, 1997; Gechev *et al.*, 2002; Rizhsky *et al.*, 2002; Gechev *et al.*, 2005) A glutathione na forma reduzida pode ser utilizada de duas principais maneiras: no ciclo da ascorbato-glutathione, na reciclagem do ascorbato a partir do dehidroascorbato; e como cofator para a atividade de eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da enzima glutathione peroxidase (GPX) (Noctor & Foyer, 1998).

Os dados relatados no presente estudo, mostram que há uma coincidência entre a queda da atividade de CAT e a indução da atividade de APX, tanto nos tratamentos com estresse hídrico e salino isolados, como em combinação com o 3-AT. O aumento na atividade de APX em condições de alta luminosidade foi observado em plantas tratadas com 3-AT

(Gechev *et al.*, 2002), e houve uma indução do seu respectivo mRNA em plantas de fumo com o gene da CAT silenciado, expostas a mesma situação (Willenkens *et al.*, 1997). Pnueli *et al.* (2003) e Davletova *et al.* (2005) afirmaram que a APX citossólica tem um papel central no controle do *status* redox da célula, e que pode estar diretamente envolvida na eliminação das moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que vazam dos cloroplastos e peroxissomos, principalmente durante condições de estresse, onde a atividade de CAT pode sofrer severas reduções, devido à sensibilidade desta enzima (Schmidt *et al.*, 2006). Com base nestas informações, pode-se corretamente afirmar que os maiores valores da atividade de APX, nas plantas submetidas a diferentes estresses em condições ambientais testadas, estão diretamente relacionados com a diminuição da atividade da CAT.

A forte indução da enzima APX observada no Experimento III, nas plantas tratadas apenas com NaCl podem estar relacionados ao menor índice de peroxidação de lipídeos evidenciados neste tratamento, em relação as plantas controle, em ambas as condições ambientais (FIGURAS 34A e 39). De forma análoga, percebe-se que houve um aumento no indicador de TBARS associado a uma leve diminuição da atividade desta enzima, nas plantas tratadas apenas com PEG (Experimento II) (FIGURAS 20A e 25). No entanto, tal relação não foi observada nas amostras do Experimento I, o que pode ter sido ocasionado por diferenças climáticas associadas à época do ano, na qual os experimentos foram realizados (Ver Estratégia Experimental). A redução quase que completa da atividade de CAT, devido a aplicação do 3-AT em combinação com os tratamentos osmóticos, induziu severos aumentos no indicador de TBARS, mesmo com uma indução da atividade e da expressão da APX. Estas observações reforçam as afirmações de Willenkens *et al.* (1997) e de Rizhsky *et al.* (2002), de que a ausência de CAT, em condições de estresse pode ser parcialmente, mas nunca completamente compensada por outros sistemas antioxidantes.

Além do aumento nos conteúdos de AsA<sub>Red</sub>, a indução da atividade de APX total foi ainda acompanhada por um acentuado incremento nos transcritos do gene da APX citossólica, da mesma forma que os relatados por Willenkens *et al.* (1997). Ao mesmo tempo, os maiores níveis de expressão relativa da cAPX foram observados nas plantas tratadas com 3-AT. Esta indução na transcrição destes genes está diretamente relacionada com a forte repressão da CAT, sugerindo uma controlada sincronia entre a expressão e a atividade enzimática destes dois sistemas, na regulação e desintoxicação das AOS produzidas na célula vegetal, durante situações de estresse ambiental.

## 9. SÍNTESE E CONCLUSÃO FINAL

Os resultados apresentados sugerem que os danos provocados pelos estresses hídrico e salino podem estar relacionados a um estresse oxidativo, iniciado como consequência de um desequilíbrio entre as fases bioquímicas e fotoquímicas da fotossíntese, bem como um aumento do processo de fotorrespiração. A acentuada diminuição na atividade de catalase como consequência da aplicação do composto 3-AT em folhas de feijão caupi, foi acompanhada por uma indução do sistema antioxidante enzimático da APX e de um aumento do conteúdo de  $AsA_{Red}$ , em ambas as condições ambientais testadas. No entanto, os acentuados aumentos na atividade enzimática e na expressão dos mRNAs de cAPX, nas plantas submetidas a condições semelhantes as do semi-árido nordestino não foram suficientes para atenuar os sintomas de morte celular programada e de peroxidação de lipídeos, decorrentes de uma maior acumulação de  $H_2O_2$ , em plantas de feijão caupi, submetidas a estresse hídrico ou salino, combinados com a aplicação do inibidor de CAT, 3-AT.

Os resultados apresentados no presente estudo indicam que há uma controlada sincronia entre os sistemas antioxidantes enzimáticos da CAT e da APX, envolvendo mecanismos moleculares, como a expressão de mRNAs, e bioquímicos, como a atividade enzimática, na regulação e desintoxicação das AOS produzidas na célula vegetal, durante situações de estresse ambiental.

## 10. Referências Bibliográficas

- AB'SÁBER, A. N. Sertões e sertanejos: uma geografia humana sofrida. **Estudos Avançados**, v. 13, p. 7-59. 1999.
- AGARWAL, P. K., AGARWAL, P., REDDY, M. K. e SOPORY, S. K. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 12, p. 1263-1274. 2006.
- ALSCHER, R. G., ERTURK, N. e HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341. 2002.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. e LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402. 1997.
- AMORY, A. M., FORD, L., PAMMENTER, N. W. e CRESSWELL, C. F. The use of 3-amino-1,2,4-triazole to investigate the short-term effects of oxygen toxicity on carbon assimilation by *Pisum sativum* seedlings. **Plant, Cell & Environment**, v. 15, n. 6, p. 655-663. 1992.
- APEL, K. e HIRT, H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399. 2004.
- ASADA, K. The Water-Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, n. 1, p. 601-639. 1999.
- ASAI, N., MATSUYAMA, T., TAMAOKI, M., NAKAJIMA, N., KUBO, A., AONO, M., KATO, T., TABATA, S., SHIRANO, Y. e SHIBATA, D. Compensation for lack of a cytosolic ascorbate peroxidase in an *Arabidopsis* mutant by activation of multiple antioxidative systems. **Plant Science**, v. 166, n. 6, p. 1547-1554. 2004.
- BAIER, M., NOCTOR, G., FOYER, C. H. e DIETZ, K. J. Antisense suppression of 2-cysteine peroxiredoxin in *Arabidopsis* specifically enhances the activities and expression of enzymes associated with ascorbate metabolism but not glutathione metabolism. **Plant Physiology**, v. 124, n. 2, p. 823-832. 2000.
- BEAUCHAMP, C. e FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287. 1971.
- BECANA, M., DALTON, D. A., MORAN, J. F., ITURBE-ORMAETXE, I., MATAMOROS, M. A. e RUBIO, M. C. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. **Physiologia Plantarum**, v. 109, p. 372-381. 2000.
- BIENERT, G. P., SCHJOERRING, J. K. e JAHN, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1758, n. 8, p. 994-1003. 2006.
- BLOKHINA, O., VIROLAINEN, E. e FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany (London)**, v. 91 Spec No, p. 179-194. 2003.

BLUMWALD, E., AHARON, G. S. e APSE, M. P. Sodium transport in plant cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1465, p. 140-151. 2000.

BOHNERT, H. J., GONG, Q., LI, P. e MA, S. Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms - getting genomics going. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 180-188. 2006.

BOHNERT, H. J., NELSON, D. E. e JENSEN, R. G. Adaptations to Environmental Stresses. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1099-1111. 1995.

BOTA, J., MEDRANO, H. e FLEXAS, J. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? **New Phytologist**, v. 162, n. 3, p. 671-681. 2004.

BOWLER, C. e FLUHR, R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 6, p. 241-246. 2000.

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

BRAY, E. A. Plant Responses to Water Deficit. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 2, p. 48-54. 1997.

BRAY, E. A., BAILEY-SERRES, J. e WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: B. B. Buchanan, W. Gruissem e R. L. Jones (Ed.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1158-1203

BRUCE, W. B., EDMEADES, G. O. e BARKER, T. C. Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 366, p. 13-25. 2002.

BUCHANAN, B. B. e BALMER, Y. Redox Regulation: A Broadening Horizon. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, n. 1, p. 187-220. 2005.

BÜSSIS, D., KAUDER, F. e HEINEKE, D. Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit I. Photosynthesis and metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 325, p. 1349-1360. 1998.

CAIRO, P. A. R. **Relações Hídricas de Plantas**. Vitória da Conquista: UESB, v. 1995. 32 p.

CAMPOS, P. S., RAMALHO, J. C., LAURIANO, J. A., SILVA, M. J. e MATOS, M. D. C. Effects of drought on photosynthetic performance and water relations of four *Vigna* genotypes. **Photosynthetica**, v. 36, n. 1-2, p. 79-87. 1999.

CARDOSO, B. B. **Efeitos comparativos da salinidade sobre o metabolismo do nitrogênio em folhas e nódulos de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] inoculado com *Bradyrhizobium sp.*** (Tese de Doutorado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE., 2000. 110 p.

CAVALCANTI, F. R. **Atividade de enzimas antioxidativas e integridade de membranas em plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] submetidas ao estresse salino.** (Dissertação de Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2002. 120 p.

- CAVALCANTI, F. R., OLIVEIRA, J. T. A., MARTINS-MIRANDA, A. S., VIEGAS, R. A. e SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v. 163, n. 3, p. 563-571. 2004.
- CAVALCANTI, F. R., SANTOS LIMA, J. P. M., FERREIRA-SILVA, S. L., VIEGAS, R. A. e SILVEIRA, J. A. G. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 5, p. 591-600. 2007.
- CHAVES, M. M., MAROCO, J. P. e PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 239-264. 2003.
- CHAVES, M. M. e OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 407, p. 2365-2384. 2004.
- CHAVES, M. M., PEREIRA, J. S., MAROCO, J., RODRIGUES, M. L., RICARDO, C. P. P., OSORIO, M. L., CARVALHO, I., FARIA, T. e PINHEIRO, C. How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and Growth. **Annals of Botany**, v. 89, n. 7, p. 907-916. 2002.
- CHEESEMAN, J. M. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 2435-2444. 2006.
- CHEW, O., WHELAN, J. e MILLAR, H. Molecular definition of the Ascorbate-Glutathione Cycle in *Arabidopsis* mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 47, p. 46869-46977. 2003.
- CHINNUSAMY, V., SCHUMAKER, K. e ZHU, J. K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 395, p. 225-236. 2004.
- CONKLIN, P. L., WILLIAMS, E. H. e LAST, R. L. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. **PNAS**, v. 93, n. 18, p. 9970-9974. 1996.
- CÓRDOBA-PEDREGOSA, M. D. C., CÓRDOBA, F., VILLALBA, J. M. e GONZÁLEZ-REYES, J. A. Zonal changes in ascorbate and hydrogen peroxide contents, peroxidase e ascorbate-relates enzyme activities in onion roots. **Plant Physiology**, v. 131, p. 697-706. 2003.
- CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - not by affecting ATP synthesis. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 187-188. 2000.
- CREISSEN, G., FIRMIN, J., FRYER, M., KULAR, B., LEYLAND, N., REYNOLDS, H., PASTORI, G., WELLBURN, F., BAKER, N., WELLBURN, A. e MULLINEAUX, P. Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. **Plant Cell**, v. 11, n. 7, p. 1277-1292. 1999.
- D'ARCY-LAMETA, A., FERRARI-ILIOU, R., CONTOUR-ANSEL, D., PHAM-THI, A.-T. e ZUILY-FODIL, Y. Isolation and Characterization of Four Ascorbate Peroxidase cDNAs Responsive to Water Deficit in Cowpea Leaves. **Annals of Botany**, v. 97, n. 1, p. 133-140. 2006.
- DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVÁ, E., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D. e VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v. 57, n. 5, p. 779-795. 2000.

DAT, J. F., PELLINEN, R., VAN DE COTTE, B., LANGEBARTELS, C., KANGASJARVI, J., INZE, D. e VAN BREUSEGEM, F. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. **The Plant Journal**, v. 33, n. 4, p. 621-632. 2003.

DAVLETOVA, S., RIZHISKY, L., LIANG, H. J., ZHONG, S. Q., OLIVER, D. J., COUTU, J., SHULAEV, V., SCHLAUCH, K. e MITTLER, R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 17, n. 1, p. 268-281. 2005.

DE CARVALHO, M. H. C., LAFFRAY, D. e LOUGUET, P. Comparison of the physiological responses of *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* cultivars when submitted to drought conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 40, n. 3, p. 197-207. 1998.

DEL LONGO, O. T., GONZÁLEZ, C. A., PASTORI, G. M. e TRIPPI, V. S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant Cell Physiology**, v. 4, p. 1023-1028. 1993.

DEL RIO, L. A., CORPAS, F. J., SANDALIO, L. M., PALMA, J. M., GOMEZ, M. e BARROSO, J. B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1255-1272. 2002.

DEL RIO, L. A., PASTORI, G. M., PALMA, J. M., SANDALIO, L. M., SEVILLA, F., CORPAS, F. J., JIMENEZ, A., LOPEZ-HUERTAS, E. e HERNANDEZ, J. A. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. **Plant Physiology**, v. 116, n. 4, p. 1195-1200. 1998.

DEL RIO, L. A., SANDALIO, L. M., CORPAS, F. J., PALMA, J. M., ROMERO-PUERTAS, M. C., GOMEZ, M. e BARROSO, J. B. Peroxisomes in oxidative stress and cell signaling. **Free Radical Research**, v. 37, p. 32-32. 2003.

DNOCS. **Barragens no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Ministério do Interior - Departamento Nacional de Obras contra as Secas (DNOCS), v. 1982. 160 p.

DUTILLEUL, C., GARMIER, M., NOCTOR, G., MATHIEU, C., CHETRIT, P., FOYER, C. H. e DE PAEPE, R. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. **Plant Cell**, v. 15, n. 5, p. 1212-1226. 2003.

EHLERS, J. D. e HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Field Crops Research**, v. 53, p. 187-204. 1997.

EPSTEIN, E., NORLYN, J. D., RUSH, D. W., KINGSBURY, R. W., KELLEY, D. B., CUNNINGHAM, G. A. e WRONA, A. F. Saline Culture of Crops - A Genetic Approach. **Science**, v. 210, n. 4468, p. 399-404. 1980.

FAO. **Crops and Drops - Making the Best Use of Water for Agriculture**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO 2002.

\_\_\_\_\_. **World Agriculture: Towards 2015/2030 - An FAO Perspective**. London: Food and Agriculture Organization of The United Nations - FAO, v. 2003. 444 p.

\_\_\_\_\_. **Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-affected Soils**. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>. 2005. Acessado em: 25/05/2007.



\_\_\_\_\_. **Adaptation to climate change in agriculture, forestry and fisheries: Perspective, framework and priorities.** Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of The United Nations, v. 2007. 33 p.

FERREIRA, D. F. Análises Estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. **45<sup>a</sup> Reunião anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria.** São Carlos, SP.: Universidade Federal de São Carlos: 255-258 p. 2000.

FISCHER, G., SHAH, M. e VAN VELTHUIZEN, H. **Climate Change and Agricultural Vulnerability.** Vienna, Austria: International Institute for Applied Systems Analysis - IIASA, v. 2002. 160 p.

FLEXAS, J. e MEDRANO, H. Drought-inhibition of Photosynthesis in C3 Plants: Stomatal and Non-stomatal Limitations Revisited. **Annals of Botany**, v. 89, n. 2, p. 183-189. 2002.

FLOWERS, T. J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 396, p. 307-319. 2004.

FLOWERS, T. J., KOYAMA, M. L., FLOWERS, S. A., SUDHAKAR, C., SINGH, K. P. e YEO, A. R. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 342, p. 99-106. 2000.

FLOWERS, T. J. e YEO, A. R. Breeding for salinity resistance in crop plants - where next? **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n., p. 875-884. 1995.

FOYER, C. H., LOPEZDELGADO, H., DAT, J. F. e SCOTT, I. M. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 2, p. 241-254. 1997.

FOYER, C. H. e NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. **New Phytologist**, v. 146, n. 3, p. 359-388. 2000.

\_\_\_\_\_. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, n. 3, p. 355-364. 2003.

\_\_\_\_\_. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant Cell and Environment**, v. 28, n. 8, p. 1056-1071. 2005.

FREITAS, J. B. S. **Respostas fisiológicas ao estresse salino por duas cultivares contrastantes de feijão caupi.** (Tese de Doutorado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE., 2006. 134 p.

FUJITA, M., FUJITA, Y., NOUTOSHI, Y., TAKAHASHI, F., NARUSAKA, Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. e SHINOZAKI, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 436-442. 2006.

GACHON, C., MINGAM, A. e CHARRIER, B. Real-Time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1445-1454. 2004.

GAY, C., COLLINS, J. e GEBICKI, J. M. Hydroperoxide Assay with the Ferric-Xylenol Orange Complex. **Analytical Biochemistry**, v. 273, n. 2, p. 149-155. 1999.

GAY, C. e GEBICKI, J. M. A Critical Evaluation of the Effect of Sorbitol on the Ferric-Xylenol Orange Hydroperoxide Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 284, n. 2, p. 217-220. 2000.

GECHEV, T., GADJEV, I., VAN BREUSEGEM, F., INZE, D., DUKIANDJIEV, S., TONEVA, V. e MINKOV, I. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 4, p. 708-714. 2002.

GECHEV, T., MINKOV, I. e HILLE, J. Hydrogen Peroxide-induced Cell Death in *Arabidopsis*: Transcriptional and Mutant Analysis Reveals a Role of an Oxoglutarate-dependent Dioxygenase Gene in the Cell Death Process. **IUBMB Life**, v. 57, n., p. 181-188. 2005.

GECHEV, T. S. e HILLE, J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. **Journal of Cell Biology**, v. 168, n. 1, p. 17-20. 2005.

GHANNOUM, O., CONROY, J. P., DRISCOLL, S. P., PAUL, M. J., FOYER, C. H. e LAWLOR, D. W. Nonstomatal limitations are responsible for drought-induced photosynthetic inhibition in four C<sub>4</sub> grasses. **New Phytologist**, v. 159, p. 599-608. 2003.

GIANNOPOLITIS, C. N. e RIES, S. K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiol.**, v. 59, n. 2, p. 309-314. 1977.

GIGON, A., MATOS, A.-R., LAFFRAY, D., ZUILY-FODIL, Y. e PHAM-THI, A.-T. Effect of Drought Stress on Lipid Metabolism in the Leaves of *Arabidopsis thaliana* (Ecotype Columbia). **Annals of Botany**, v. 94, n. 3, p. 345-351. 2004.

GROVER, A., KAPOOR, A., LAKSHMI, O. S., AGARWAL, S., SAHI, C., KATIYAR-AGARWAL, S., AGARWAL, M. e DUBEY, H. Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. **Current Science**, v. 80, n. 2, p. 206-216. 2001.

HARE, P. D., CRESS, W. A. e VAN STADEN, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 21, p. 535-553. 1998.

HASEGAWA, P. M., BRESSAN, R. A., ZHU, J. K. e BOHNERT, H. J. Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463-499. 2000.

HAVIR, E. A. The *In Vivo* and *In Vitro* Inhibition of Catalase from Leaves of *Nicotiana sylvestris* by 3-Amino-1,2,4-Triazole. **Plant Physiology**, v. 99, n. 2, p. 533-537. 1992.

HAVIR, E. A. e MCHALE, N. A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco-Leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455. 1987.

HEATH, R. L. e PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189-198. 1968.

HENZLER, T. e STEUDLE, E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 353, p. 2053-2066. 2000.

HERTWIG, B., STREB, P. e FEIERABEND, J. Light Dependence of Catalase Synthesis and

Degradation in Leaves and the Influence of Interfering Stress Conditions. **Plant Physiology**, v. 100, n. 3, p. 1547-1553. 1992.

HOAGLAND, D. R. e ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley, CA, USA.: California Agricultural Experiment Station, University of California. 1950.

HOEKSTRA, F. A., GOLOVINA, E. A. e BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 9, p. 431-438. 2004.

IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil: 1987**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, v. 48. 1988. 736 p.

INGRAM, J. e BARTELS, D. The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p. 377-403. 1996.

INZÉ, D. e VAN MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 153-158. 1995.

JIMÉNEZ, A., HERNANDEZ, J. A., DEL RIO, L. A. e SEVILLA, F. Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. **Plant Physiology**, v. 114, n. 1, p. 275-284. 1997.

JONES, H. G. e JONES, M. B. Introduction: Some terminology and common mechanisms. In: H. G. Jones, T. J. Flowers e M. B. Jones (Ed.). **Plants under Stress**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. p. 1-10.

JONES, M. M., TURNER, N. C. e OSMOND, C. B. Mechanisms of Drought Resistance. In: L. G. Paleg e D. Aspinall (Ed.). **The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants**. Sydney: Academic Press, 1981. p.15-35.

JÚNIOR, J. M. **Expressão de Caracteres Fisiológicos induzidos por Estresse Salino em três progênies de Cajueiro**. (Tese de Doutorado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará Fortaleza, CE, 2002. 157 p.

KARPINSKI, S., ESCOBAR, C., KARPINSKA, B., CREISSEN, G. e MULLINEAUX, P. M. Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. **Plant Cell**, v. 9, n. 4, p. 627-640. 1997.

KAUFMANN, M. R. e ECKARD, A. N. Evaluation of Water Stress Control with Polyethylene Glycols by Analysis of Guttation. **Plant Physiology**, v. 47, n. 4, p. 453-456. 1971.

KLIEBENSTEIN, D. J., MONDE, R. e LAST, R. L. Superoxide Dismutase in *Arabidopsis*: An Ectopic Enzyme Family with Disparate Regulation and Protein Localization. **Plant Physiology**, v. 118, p. 637-650. 1998.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant Cell Physiology**, v. 34, p. 713-721. 1993.

KRAMER, P. J. e BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. New York: Academic Press. 1995. 495 p.

LAMB, C. e DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of**

**Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, n., p. 251-275. 1997.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos, SP: RiMa Artes e Texto. 2000. 319 p.

LAW, M. Y., CHARLES, S. A. e HALLIWELL, B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat. **Biochemical Journal**, v. 210, n. 3, p. 899-903. 1983.

LAWLOR, D. W. Limitation to Photosynthesis in Water-stressed Leaves: Stomata vs. Metabolism and the Role of ATP. **Annals of Botany**, v. 89, n. 7, p. 871-885. 2002.

LAWLOR, D. W. e CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, p. 275-294. 2002.

LE HOUÉROU, H. N. Climate change, drought and desertification. **Journal of Arid Environments**, v. 34, p. 133-185. 1996.

LEVITT, J. **Responses of Plant to Environmental Stresses: Water, Salt and Other Stresses**. New York: Academic Press, v. II. 1980. 606 p.

LICHTNER, F. T. Amitrole Absorption by Bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv 'Red Kidney') Roots: Mechanism of Absorption. **Plant Physiology**, v. 71, n. 2, p. 307-312. 1983.

LIU, Y., FISKUM, G. e SCHUBERT, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, n. 5, p. 780-787. 2002.

LIVAK, K. J. e SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, p. 402-408. 2001.

LUNA, C. M., PASTORI, G. M., DRISCOLL, S., GROTEN, K., BERNARD, S. e FOYER, C. H. Drought controls on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation, catalase (CAT) activity and *CAT* gene expression in wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 411, p. 417-423. 2005.

LUTTS, S. **Étude des mécanismes de résistance à la salinité, chez le riz (*Oryza sativa* L.): variation somaclonale et stratégie d'amélioration par utilisation des cultures in vitro**. (Doctorate). Université Catholique de Louvain. 1996. 350 p.

MAHAJAN, S. e TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, n. 2, p. 139-158. 2005.

MAIA, J. M. **Efeitos aditivos e interativos de tratamentos de seca e NaCl na resposta antioxidativa de raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* L. (Walp.)]**. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE., 2004. 129 p.

MANO, J., OHNO, C., DOMAE, Y. e ASADA, K. Chloroplastic ascorbate peroxidase is the primary target of methylviologen-induced photooxidative stress in spinach leaves: its relevance to monodehydroascorbate radical detected with in vivo ESR. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1504, n. 2-3, p. 275-287. 2001.

MARCELLINO, L. H. e GROSSI DE SÁ, M. F. Detecção e Análise de Proteínas pela técnica de *Western Blot*. In: A. C. M. Brasileiro e V. T. C. Carneiro (Ed.). **Manual de transformação**

**genética de plantas.** Brasília, DF.: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, 1998. p.251-276.

MARGOLIASH, E. e NOVOGRODSKY, A. A study of the inhibition of catalase by 3-Amino-1,2,4-triazole. **Biochemical Journal**, v. 68, p. 468-475. 1958.

MARGOLIASH, E., NOVOGRODSKY, A. e SCHJEJTER, A. Irreversible reaction of 3-Amino-1,2,4-triazole and related inhibitors with the protein of catalase. **Biochemical Journal**, v. 74, p. 339-348. 1960.

MAXWELL, D. P., WANG, Y. e MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **PNAS**, v. 96, n. 14, p. 8271-8276. 1999.

MCCLUNG, C. R. Regulation of Catalases in *Arabidopsis*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 3, p. 489-496. 1997.

MCDANIEL, C. N., HOLTERMAN, R. K., BONE, R. F. e WOZNIAK, P. M. Amino Acid Transport in Suspension-Cultured Plant Cells: III. Common Carrier System for the Uptake of L-Arginine, L-Aspartic Acid, L-Histidine, L-Leucine, and L-Phenylalanine. **Plant Physiology**, v. 69, n. 1, p. 246-249. 1982.

MENGEL, K. e KIRKBY, E. A. **Principles of Plant Nutrition.** Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, v. 2001. 848 p.

MEXAL, J., FISHER, J. T., OSTERYOUNG, J. e REID, C. P. P. Oxygen Availability in Polyethylene Glycol Solutions and Its Implications in Plant-Water Relations. **Plant Physiology**, v. 55, n. 1, p. 20-24. 1975.

MICHEL, B. E. e KAUFMANN, M. R. The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. **Plant Physiology**, v. 51, n. 5, p. 914-916. 1973.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci.**, v. 7, n. 9, p. 405-410. 2002.

\_\_\_\_\_. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15-19. 2006.

MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M. e VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 10, p. 490-498. 2004.

MITTOVA, V., TAL, M., VOLOKITA, M. e GUY, M. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. **Plant Cell and Environment**, v. 26, n. 6, p. 845-856. 2003.

MØLLER, I. M. Plant Mitochondria and Oxidative Stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 561-591. 2001.

MONEY, N. P. Osmotic Pressure of Aqueous Polyethylene Glycols: Relationship between Molecular Weight and Vapor Pressure Deficit. **Plant Physiology**, v. 91, n. 2, p. 766-769. 1989.

MONTEIRO DE PAULA, F., PHAM-THI, A.-T., ZUILY-FODIL, Y., FERRARI-ILIOU, R., VIEIRA

DA SILVA, J. e MAZLIAK, P. Effect of water stress on the biosynthesis and degradation of polyunsaturated lipid molecular species in leaves of *Vigna unguiculata*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 31, p. 707-715. 1993.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 2, p. 239-250. 2002.

\_\_\_\_\_. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, v. 167, n. 3, p. 645-663. 2005.

MUNNS, R., JAMES, R. A. e LAUCHLI, A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 5, p. 1025-1043. 2006.

NAKANO, Y. e ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 1068-1072, p. 1981.

NEILL, S. J., DESIKAN, R., CLARKE, A., HURST, R. D. e HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1237-1247. 2002.

NEPOMUCENO, A. L., OOSTERHUIS, D. M. e STEWART, J. M. Physiological responses of cotton leaves and roots to water deficit induced by polyethylene glycol. **Environmental and Experimental Botany**, v. 40, n. 1, p. 29-41. 1998.

NETTING, A. G. pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions: cellular responses to stress and their implication for plant water relations. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 343, p. 147-158. 2000.

NICOT, N., HAUSMAN, J.-F., HOFFMANN, L. e EVERS, D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 421, p. 2907-2914. 2005.

NOCTOR, G. e FOYER, C. H. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249-279. 1998.

NOCTOR, G., VELJOVIC-JOVANOVIC, S., DRISCOLL, S., NOVITSKAYA, L. e FOYER, C. H. Drought and Oxidative Load in the Leaves of C<sub>3</sub> Plants: a Predominant Role for Photorespiration? **Annals of Botany**, v. 89, p. 841-850. 2002.

NYATHI, Y. e BAKER, A. Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. **Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 12, p. 1478-1495. 2006.

OP DEN CAMP, R. G., PRZYBYLA, D., OCHSENBEIN, C., LALOI, C., KIM, C., DANON, A., WAGNER, D., HIDEG, E., GOBEL, C., FEUSSNER, I., NATER, M. e APEL, K. Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 15, n. 10, p. 2320-2332. 2003.

O'TOOLE, J. C. e CHANG, T. T. Drought resistance in cereals. Rice: A case study. In: H. Mussel e R. Staples (Ed.). **Stress Physiology in Crop Plants**. New York: Wiley Interscience, 1979. Drought resistance in cereals. p. 373-405.

PALATNIK, J. F., VALLE, E. M., FEDERICO, M. L., GOMEZ, L. D., MELCHIORRE, M. N., PALEO, A. D., CARRILLO, N. e ACEVEDO, A. Status of antioxidant metabolites and enzymes in a

catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Science**, v. 162, n. 3, p. 363-371. 2002.

PARRY, M. A. J., ANDRALOJC, P. J., KHAN, S., LEA, P. J. e KEYS, A. J. Rubisco Activity: Effects of Drought Stress. **Annals of Botany**, v. 89, n. 7, p. 833-839. 2002.

PASSIOURA, J. B. Drought and Drought Tolerance. In: E. Belhassen (Ed.). **Drought Tolerance in Higher Plants. Genetical, physiological and molecular biological analysis**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 1-5.

\_\_\_\_\_. Soil conditions and Plant Growth. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n., p. 311-318. 2002.

PEIXOTO, P. H. P., CAMBRAIA, J., SANT'ANNA, R., MUSQUIM, R. e MOREIRA, M. A. Aluminum effect on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 137-143. 1999.

PIMENTEL, C. **A Relação da Planta com a Água**. Seropédica - RJ: Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, v. 2004. 191 p.

PNUELI, L., LIANG, H., ROZENBERG, M. e MITTLER, R. Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (*Apx1*)-deficient *Arabidopsis* plants. **The Plant Journal**, v. 34, n. 2, p. 187-203. 2003.

POLIDOROS, A. N. e SCANDALIOS, J. G. Response of the Maize Catalases to Light. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 3, p. 497-504. 1997.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. **Plant Physiology**, v. 126, n. 1, p. 445-462. 2001.

RACUSEN, D. The metabolism and translocation of 3-aminotriazole in plants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 74, n. 1, p. 106-113. 1958.

RAMANJULU, S. e BARTELS, D. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n., p. 141-151. 2002.

RAO, I. M. Role of Physiology in Improving Crop Adaptation to Abiotic Stresses in the Tropics: The Case of Common Bean and Tropical forages. In: M. Pessaraki (Ed.). **Handbook of Plant and Crop Physiology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. p. 583-614.

REDDY, A. R., CHAITANYA, K. V. e VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 11, p. 1189-1202. 2004.

RENGASAMY, P. World Salinization with emphasis on Australia. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 5, p. 1017-1023. 2006.

RHODES, D. Metabolic Responses to Stress. In: P. K. Stumpf e E. E. Conn (Ed.). **Physiology of Metabolism**. London: Academic Press, Inc., v.12, 1987. p. 202-241. (The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise).

RIEDERER, M. e SCHREIBER, L. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 363, p. 2023-2032. 2001.

RIZHSKY, L., HALLAK-HERR, E., VAN BREUSEGEM, F., RACHMILEVITCH, S., BARR, J. E., RODERMEL, S., INZE, D. e MITTLER, R. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. **Plant Journal**, v. 32, n. 3, p. 329-342. 2002.

RIZHSKY, L., LIANG, H. e MITTLER, R. The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 40, p. 38921-38925. 2003.

RIZHSKY, L., LIANG, H., SHUMAN, J., SHULAEV, V., DAVLETOVA, S. e MITTLER, R. When Defense Pathways Collide. The Response of *Arabidopsis* to a Combination of Drought and Heat Stress. **Plant Physiology**, v. 134, n. 4, p. 1683-1696. 2004.

ROCKSTRÖUM, J. e FALKENMARK, M. Semiarid Crop Production from a Hydrological Perspective: Gap between Potential and Actual Yields. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n. 4, p. 319 - 346. 2000.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos Vegetais. In: A. C. M. Brasileiro e V. T. C. Carneiro (Ed.). **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília, DF.: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, 1998. p.163-177.

SALISBURY, F. B. e ROSS, C. W. **Plant Physiology**: Wadsworth Pub. Corp.. 1992. 590 p.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. e MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 3. 1989. 1021 p.

SANTA-CRUZ, A., MARTINEZ-RODRIGUEZ, M. M., PEREZ-ALFOCEA, F., ROMERO-ARANDA, R. e BOLARIN, M. C. The rootstock effect on the tomato salinity response depends on the shoot genotype. **Plant Science**, v. 162, n. 5, p. 825-831. 2002.

SAUTER, A., DAVIES, W. J. e HARTUNG, W. The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 363, p. 1991-1997. 2001.

SCANDALIOS, J. G. Introduction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 3, p. 471-472. 1997.

SCHMIDT, M., GRIEF, J. e FEIERABEND, J. Mode of translational activation of the catalase (cat1) mRNA of rye leaves (*Secale cereale* L.) and its control through blue light and reactive oxygen. **Planta**, v. 223, n. 4, p. 835-846. 2006.

SCHUPPLER, U., HE, P.-H., JOHN, P. C. L. e MUNNS, R. Effect of Water Stress on Cell Division and Cdc2-Like Cell Cycle Kinase Activity in Wheat Leaves. **Plant Physiology**, v. 117, n. 2, p. 667-678. 1998.

SERRAJ, R. e SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n., p. 333-341. 2002.

SERRANO, R., MULET, J. M., RIOS, G., MARQUEZ, J. A., LARRINOA, I. F., LEUBE, M. P., MENDIZABAL, I., PASCUAL-AHUIR, A., PROFT, M., ROS, R. e MONTESINOS, C. A glimpse of



the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, Special Issue, p. 1023-1036. 1999.

SHALATA, A. e NEUMANN, P. M. Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 364, p. 2207-2211. 2001.

SHAO, H. B., GUO, Q. J., CHU, L. Y., ZHAO, X. N., SU, Z. L., HU, Y. C. e CHENG, J. F. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 54, n. 1, p. 37-45. 2007.

SHARP, R. E. Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 2, p. 211-222. 2002.

SHARP, R. E. e LENOBLE, M. E. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 366, p. 33-37. 2002.

SHIGEOKA, S., ISHIKAWA, T., TAMOI, M., MIYAGAWA, Y., TAKEDA, T., YABUTA, Y. e YOUSHIKAWA, K. Regulation and Function of Ascorbate Peroxidase Isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1305-1319. 2002.

SILVEIRA, J. A. G., CARDOSO, B. B., MELO, A. R. B. e VIÉGAS, R. A. Salt-induced decrease in nitrate uptake and assimilation in cowpea plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 2, p. 77-82. 1999.

SILVEIRA, J. A. G., LIMA, J. P. M. S., CAVALCANTI, F. R., MAIA, J. M. e VIÉGAS, R. A. Salt induced oxidative response in plants: Damage or Protection? In: R. J. M. C. Nogueira, E. L. Araújo, L. G. Willadino e U. M. T. Cavalcante (Ed.). **Estresses Ambientais: Danos e Benefícios em Plantas**. Recife, PE: MXM Gráfica e Editora, 2005. p.106-117.

SILVEIRA, J. A. G., MELO, A. R. B., VIEGAS, R. A. e OLIVEIRA, J. T. A. Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, n. 2, p. 171-179. 2001.

SILVEIRA, J. A. G., VIEGAS, R. D. A., ROCHA, I. M. A. D., MOREIRA, A. C. D. O. M., MOREIRA, R. D. A. e OLIVEIRA, J. T. A. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, n. 2, p. 115-123. 2003.

SINGER, S. R. e MCDANIEL, C. N. Transport of the Herbicide 3-Amino-1,2,4-Triazole by Cultured Tobacco Cells and Leaf Protoplasts. **Plant Physiology**, v. 69, n. 6, p. 1382-1386. 1982.

SLAVIK, B. **Methods of studying plant water relations**. New York: Springer Verlag, v. 1974. 449 p.

SLESÁK, I., MISZALSKI, Z., KARPINSKA, B., NIEWIADOMSKA, E., RATAJCZAK, R. e KARPINSKI, S. Redox control of oxidative stress response in the C<sub>3</sub>-CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 669-677. 2002.

SMIRNOFF, N. Botanical Briefing: The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. **Annals of Botany**, v. 78, n. 6, p. 661-669. 1996.

\_\_\_\_\_. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 355, p. 1455-1464. 2000.

\_\_\_\_\_. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 229-235. 2000.

SMITH, I. K. Stimulation of Glutathione Synthesis in Photorespiring Plants by Catalase Inhibitors. **Plant Physiology**, v. 79, n. 4, p. 1044-1047. 1985.

SOUZA, R. P., MACHADO, E. C., SILVA, J. A. B., LAGOA, A. M. M. A. e SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany**, v. 51, n. 1, p. 45-56. 2004.

STEUTER, A. A., MOZAFAR, A. e GOODIN, J. R. Water Potential of Aqueous Polyethylene Glycol. **Plant Physiology**, v. 67, n. 1, p. 64-67. 1981.

STOREY, R. e WALKER, R. R. Citrus and Salinity. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 39-81. 1999.

SWINDALE, L. D. e BIDINGER, F. R. Introduction: The Human consequences of drought and crop research priorities for their alleviation. In: L. G. Paleg e D. Aspinall (Ed.). **The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants**. Sydney: Academic Press Australia, 1981. p.1-13.

TAIZ, L. e ZIEGER, E. **Plant Physiology**. Sunderland: Sinauer Associates, v. 2004. 798 p.

TESTER, M. e DAVENPORT, R. Na<sup>+</sup> Tolerance and Na<sup>+</sup> Transport in Higher Plants. **Annals of Botany**, v. 91, n. 5, p. 503-527. 2003.

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. e HIGGINS, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882. 1997.

TSUGANE, K., KOBAYASHI, K., NIWA, Y., OHBA, Y., WADA, K. e KOBAYASHI, H. A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. **Plant Cell**, v. 11, n. 7, p. 1195-1206. 1999.

TÜRKAN, I., BOR, M., OZDEMIR, F. e KOCA, H. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. **Plant Science**, v. 168, n. 1, p. 223-231. 2005.

TURNER, N. C. Adaptation to water deficits: a changing perspective. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 43, p. 175-190. 1986.

TYERMAN, S. D., NIEMIETZ, C. M. e BRAMLEY, H. Plant Aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, p. 173-194. 2002.

UMEZAWA, T., MIZUNO, K. e FUJIMURA, T. Discrimination of genes expressed in response to the ionic or osmotic effect of salt stress in soybean with cDNA-AFLP **Plant Cell and**

**Environment**, v. 25, p. 1617-1625. 2002.

VAN BREUSEGEM, F., VRANOVA, E., DAT, J. F. e INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, n. 3, p. 405-414. 2001.

VANDENABEELE, S., VANDERAUWERA, S., VUYLSTEKE, M., ROMBAUTS, S., LANGEBARTELS, C., SEIDLITZ, H. K., ZABEAU, M., VAN MONTAGU, M., INZ, EACUTE, D e VAN BREUSEGEM, F. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 39, p. 45-58. 2004.

VASHISHT, A. A. e TUTEJA, N. Stress responsive DEAD-box helicases: A new pathway to engineer plant stress tolerance. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, p. 150-160. 2006.

VELJOVIC-JOVANOVIC, S., NOCTOR, G. e FOYER, C. H. Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 6-8, p. 501-507. 2002.

VERSLUES, P. E., AGARWAL, M., KATIYAR-AGARWAL, S., ZHU, J. H. e ZHU, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **Plant Journal**, v. 45, n. 4, p. 523-539. 2006.

VIÉGAS, R. A. e SILVEIRA, J. A. G. Ammonia assimilation and proline accumulation in young cashew plants during long term exposure to NaCl-Salinity. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 3, p. 153-159. 1999.

VIÉGAS, R. A., SILVEIRA, J. A. G., JÚNIOR, A. R. L., QUEIROZ, J. E. e FAUSTO, M. J. Effects of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation in young cashew plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 5, n. 2, p. 216-222. 2001.

VINOCUR, B. e ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 123-132. 2005.

VIVEKANANDAN, M. e GNANAM, A. Studies on the Mode of Action of Aminotriazole in the Induction of Chlorosis. **Plant Physiology**, v. 55, n. 3, p. 526-531. 1975.

VRANOVÁ, E., INZE, D. e VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1227-1236. 2002.

WILKINSON, S. e DAVIES, W. J. ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, p. 195-210. 2002.

WILLEKENS, H., CHAMNONGPOL, S., DAVEY, M., SCHRAUDNER, M., LANGEBARTELS, C., VAN MONTAGU, M., INZE, D. e VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. **EMBO Journal**, v. 16, n. 16, p. 4806-4816. 1997.

WINGLER, A., LEA, P. J., QUICK, W. P. e LEEGOOD, R. C. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. **Philosophical Transactions of The Royal Society: Biological Sciences**, v. 355, p. 1517-1529. 2000.

WINICOV, I. New Molecular Approaches to Improving Salt Tolerance in Crop Plants. **Annals**

**of Botany**, v. 82, p. 703-710. 1998.

WU, G., WILEN, R. W., ROBERTSON, A. J. e GUSTA, L. V. Isolation, Chromosomal Localization, and Differential Expression of Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase and Chloroplastic Copper/Zinc Superoxide Dismutase Genes in Wheat. **Plant Physiology**, v. 120, p. 513-520. 1999.

XIONG, L., LEE, H., ISHITANI, M. e ZHU, J. K. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in Arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 10, p. 8588-8596. 2002.

XIONG, L., SCHUMAKER, K. S. e ZHU, J. K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **Plant Cell**, v. 14 Suppl, p. S165-S183. 2002.

XIONG, L. e ZHU, J. Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. **Physiologia Plantarum**, v. 112, n., p. 152-166. 2001.

XIONG, L. e ZHU, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant Cell Environment**, v. 25, n. 2, p. 131-139. 2002.

YEO, A. Review article. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 323, p. 915-929. 1998.

\_\_\_\_\_. Predicting the interaction between the effects of salinity and climate change on crop plants. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 159-174. 1999.

YEO, A. R. e FLOWERS, T. J. Nonosmotic Effects of Polyethylene Glycols upon Sodium Transport and Sodium-Potassium Selectivity by Rice Roots. **Plant Physiology**, v. 75, n. 2, p. 298-303. 1984.

YORDANOV, I., VELIKOVA, V. e TSONEV, T. Plant Responses to Drought, Acclimation, and Stress Tolerance. **Photosynthetica**, v. 38, n. 2, p. 171-186. 2000.

YOSHIMURA, K., YABUTA, Y., ISHIKAWA, T. e SHIGEOKA, S. Expression of spinach ascorbate peroxidases isoenzymes in response to oxidative stress. **Plant Physiology**, v. 123, p. 223-234. 2000.

ZÁMOCKÝ, M. e KOLLER, F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 72, n. 1, p. 19-65. 1999.

ZHU, J. K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 2, p. 66-71. 2001.

\_\_\_\_\_. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273. 2002.

ZIPPER, H., BRUNNER, H., BERNHAGEM, J. e VITZTHUM, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acid Research**, v. 32, n. 12 (e103), p. 1-10. 2004.