

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Papel da V-ATPase e de enzimas
antioxidantes nos mecanismos de ajustamento ao
estresse salino em feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*
(L.) Walp)

LUCIANA MAIA NOGUEIRA DE OLIVEIRA

Fortaleza-Ceará
2007

LUCIANA MAIA NOGUEIRA DE OLIVEIRA

Papel da V-ATPase e de enzimas
antioxidantes nos mecanismos de ajustamento ao
estresse salino em feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*
(L.) Walp)

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

Orientadora: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo
Co-Orientador: Prof. Dr. Karl-Josef Dietz

Fortaleza-Ceará
2007

Luciana Maia Nogueira de Oliveira

**Papel da V-ATPase e de enzimas
antioxidantes nos mecanismos de ajustamento ao
estresse salino em feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*
(L.) Walp)**

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

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

Tese aprovada em: 27 de Abril de 2007

Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo - Orientadora
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do
Ceará

Profa. Dra. Elena Graciela Orellano
IBR- CONICET. Depto de Biologia Molecular Universidad Nacional de
Rosário

Profa. Dra. Maria de Lourdes Oliveira Otoch
Departamento de Biologia- Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade
Federal do Ceará

Dr. José Hélio Costa Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
da universidade Federal do Ceará

AGRADECIMENTOS

Acredito que essa seja uma parte delicada da Tese, pois cinco anos se passaram desde que ingressei no curso de Doutorado e de lá para cá muita coisa aconteceu e muitas pessoas participaram em diversos papéis nessa caminhada até aqui. Dessa forma, apesar de tentar agradecer a todos que estão presentes na minha memória fatalmente esquecerei alguém, mesmo assim vou tentar....

A parte experimental desse trabalho foi realizada na Universidade de Bielefeld e na Universidade Federal do Ceará, através do Programa de Doutorado Sanduiche DAAD/CAPEs. Dessa forma, começo meu agradecimento à Profa Birgit Arnholdt-Schmitt pelo incentivo de pleitear uma bolsa nesse programa e à profa Dirce Fernandes de Melo por me apoiar e me ajudar a lutar contra o tempo e conseguir preencher todos os requisitos necessários para concorrer.

Avançando essa etapa, agradeço a minha família (pai, mãe, irmãos) e ao meu marido Gustavo pelo apoio na minha decisão de ir para a Alemanha. Agradeço aos amigos e colegas pela amizade e companheirismo que me ajudaram a superar as dificuldades encontradas em solo alemão, em especial à amiga Geovana Michael Brenner. Não posso deixar de citar os meus professores do Instituto Goethe em Göttingen, a quem devo grande parte do meu aprendizado na língua alemã.

Agradeço às instituições: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPEs) e Intercâmbio acadêmico Brasil-Alemanha (DAAD).

Na Universidade de Bielefeld agradeço principalmente ao Prof. Dr Karl-Josef Dietz, uma pessoa extraordinária, que me acolheu tão bem na Universidade e no seu país. Um exemplo de profissional versátil e acima de tudo muito competente. Agradeço aos colegas do laboratório de fisiologia vegetal W5 pela acolhida e em especial à amiga Andrea Peña, pela amizade e companheirismo. Ao colega Jeremie Calliste agradeço a contagiante alegria e a paciência em me ensinar técnicas de Biologia Molecular. Agradeço também aos professores George, Dortje Gollmack, Andrea Kandelbinder e Margareth Baier.

No Brasil, agradeço aos amigos do laboratório de Bioenergética que me acolheram novamente no laboratório e me ajudaram a continuar desenvolvendo o trabalho. Agradeço em especial a Alana e Yuri, pela amizade e por dar continuidade

ao meu trabalho, sobretudo durante minha inesperada e abençoada gravidez, momento no qual eu não poderia manipular determinados reagentes químicos.

Agradeço a todos os colegas do laboratório de Bioenergética: Hélio, Érika, Alana, Malu, Neusa, Flávio, Yuri, João Henrique, Valesca, Camila, André, Débora e Mariana, por manter sempre um clima descontraído e de companheirismo dentro do laboratório. De forma especial, agradeço à Malu pela sua amizade e apoio principalmente nos momentos difíceis no Brasil e, sobretudo na Alemanha.

Agradeço ao professor Enéas Gomes (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular) por disponibilizar a casa de vegetação para alguns experimentos.

Agradeço ao professor Thales (Departamento de Biologia) por disponibilizar o uso do termociclador.

Agradeço à professora Arlete Soares (Departamento de Biologia) e as bolsistas Ileanne e Alina pela ajuda no estudo da anatomia da raiz e por disponibilizar o seu laboratório.

Agradeço à profa. Erivalda pela ajuda na caracterização dos protocolos de atividade enzimática de enzimas antioxidantes.

Agradeço aos colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que me ajudaram de alguma forma na elaboração, discussão ou conclusão desse trabalho.

Agradeço a profa. Maria da Guia por seus conselhos tão pertinentes e pelo exemplo de ética profissional que sempre nos deu.

Agradeço à profa. Maria de Lourdes Otoch por iniciar esse alvo de estudo (bombas vacuolares de H^+) no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e principalmente por ter sido responsável pela base da minha formação acadêmica como bolsista de Iniciação Científica, transmitindo valores importantes como disciplina e responsabilidade com os experimentos e equipamentos e, sobretudo priorizando o bom relacionamento com os colegas.

Agradeço de forma especial à profa. Dirce que foi a minha primeira e única orientadora, e que me acompanha desde a iniciação científica, me passando muita

experiência, conhecimentos científicos, ética profissional e valores importantes que servem para a vida profissional e pessoal.

Agradeço ao meu tio Luiz Maia (in memoriam) por sempre me apoiar e me motivar.

Agradeço à minha família: pai, mãe e irmãos.

Agradeço ao meu marido Gustavo e meu filho Pedro que me deram um suporte emocional para finalizar essa etapa.

E finalmente agradeço a Deus que permitiu que esse trabalho se concretizasse.

À minha família.

RESUMO

O acúmulo de Na^+ no vacúolo central representa um importante mecanismo de defesa de plantas contra o estresse salino. A V-ATPase exerce papel muito importante no transporte de substâncias através da membrana vacuolar e em algumas plantas, responde ao estresse salino com aumento da expressão e atividade enzimática. No presente trabalho, duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (Vita 3 e Pérola) com diferentes graus de sensibilidade ao estresse salino foram comparadas através do estudo do desenvolvimento de plantas em resposta ao estresse salino, da atividade V-ATPásica, dos níveis relativos de proteína da subunidade A da V-ATPase (VHA-A), da quantidade de transcritos das subunidades da V-ATPase e do estudo do volume vacuolar de células meristemáticas de raízes além do estudo de atividades e quantidades relativas de enzimas antioxidantes. As cultivares Vita 3 e Pérola desenvolveram-se em meio nutritivo na ausência e na presença de NaCl (100 mM) por duas semanas. A produção de biomassa de ambas as cultivares foi sensível ao estresse salino. O peso fresco de raízes diminuiu 52% em Vita 3 e 67% em Pérola, já o peso fresco de caules diminuiu 31,7% em Vita 3 e 49% em Pérola, e o peso fresco de folhas diminuiu 51,4% em Vita 3 e 72% em Pérola, respectivamente. Análise de Western blot de extrato de raízes mostrou aumento nos níveis protéicos da subunidade A em resposta ao estresse salino em ambas as cultivares, sendo observado maior aumento na cultivar Vita 3. Não foram detectadas mudanças desses níveis nos caules de ambas as cultivares e nas folhas de Pérola. Por outro lado, os níveis dessa proteína aumentaram em folhas de Vita 3 sob condição de estresse salino. A atividade V-ATPásica aumentou em folhas de Vita 3 e em raízes de ambas as cultivares. Os níveis de transcritos para as diferentes subunidades da V-ATPase de folhas foram determinadas através de análise de macroarranjos de cDNA, que revelou regulação diferencial para as subunidades da V-ATPase em ambas as cultivares. As atividades das enzimas APX e SOD de folhas de Vita 3 não se alteraram em resposta ao estresse salino, ao passo que em raízes, a atividade da APX diminuiu e da SOD aumentou. Os níveis relativos da peroxirredoxina II-C aumentaram em folhas da cv. Vita 3 e diminuíram na cv. Pérola, enquanto os níveis da peroxirredoxina Q diminuíram em

folhas de ambas as cultivares em resposta ao estresse salino. Nossos resultados mostraram que Vita 3 é mais tolerante a estresse salino moderado (100 mM NaCl) que a cultivar Pérola e sugerem que a V-ATPase exerce um papel importante na tolerância diferencial ao estresse salino em Vita 3 e Pérola. Já as enzimas APX, SOD e Prx-Q parecem não ter protegido as referidas cultivares contra o estresse oxidativo gerado pela salinidade.

Palavras-chave: V-ATPase, Vigna, estresse salino, estresse oxidativo, antioxidantes.

ABSTRACT

The accumulation of Na⁺ in the central vacuole represents an important mechanism for plants to cope with salt stress. V-ATPase plays a very important role in energizing transport across the vacuolar membrane. In many salt tolerant plants, V-ATPase is known to respond to NaCl stress with increased expression and enzyme activity. In this study two cultivars of *Vigna unguiculata* (L.) Walp (Vita 3 and Perola) with distinct salt sensitivity were compared for V-ATPase modification in response to salinity. Parameters studied in response to NaCl were growth, V-ATPase activity, protein levels of V-ATPase subunit A (VHA) and transcript amounts. The cultivars Vita 3 and Perola were grown in the absence or presence of NaCl (up to 100 mM) for two weeks. Biomass production of both cultivars was sensitive to salt stress. Root mass decreased by 52% in Vita 3 and 67% in Perola, shoot weight by 31,7% in Vita 3 and 49% in Perola, and leaf weight by 51.4% in Vita 3 and 72% in Perola, respectively. Western blot analysis of root extracts showed increases in the level of subunit A-protein under salt stress in both cultivars, where the stimulation was stronger in Vita 3 than in Perola. Changes were neither seen in shoots of both cultivars nor leaves of Perola. VHA-A levels of leaves increased in Vita 3 upon salt stress. V-ATPase activity was enhanced in leaves of Vita 3 and in roots of both cultivars. Stimulation was greater in Vita 3. The transcript levels for different subunits from V-ATPase from leaves were determined by cDNA array analysis and revealed differential regulation of the V-ATPase subunits in both cultivars. The enzymatic activities of APX and SOD from Vita 3 leaves it was not altered under salt stress and in roots, it was observed decrease in APX and increase in SOD activity in response to salt stress. The relative levels of Peroxiredoxin II-C increased in leaves from cv. Vita 3 and decreased in Pérola, while the levels of Peroxiredoxin Q decreased in leaves from both cultivars in response to salt stress. The results show that Vita 3 is more tolerant to moderate salt stress (100mM NaCl) than Perola. The results suggest that V-ATPase play an important role in expressing differential tolerance to salt stress in Vita 3 and Perola. The enzymes APX, SOD and PRX-Q seems not protect this plant against to oxidative stress generated by salt stress.

Keywords: V-ATPase, *Vigna*, salt stress, oxidative stress, antioxidants.

LISTA DE ABREVIATURAS

μM : Micromolar

$^1\text{O}_2$: Oxigênio singlet

APX: Ascorbato peroxidase

AsA: Ascorbato

ATP: Adenosinatrifosfato

BSA: Albumina bovina serina

CAT: Catalase

cDNA: DNA complementar

Cl^- : Íon cloreto

DEPC: Dietil pirocarbonato

DIG: Digoxigenina

DNA: Ácido desoxiribonucléico

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilenodiamino tetraacético

EROs: Espécies reativas de oxigênio

F-ATPase: ATPase mitocondrial

GSH: Glutathiona reduzida

K^+ : Íon potássio

KCl: Cloreto de potássio

KOH: Hidróxido de potássio

MDAsA: Monodehidroascorbato

MgSO_4 : Sulfato de magnésio

Min: Minuto

mM: Milimolar

MMLV: Transcriptase reversa de vírus de Moloney Murine Leukemia

mRNA: RNA mensageiro

Na^+ : Íon sódio

NaCl: Cloreto de sódio

NADH: Nicotinamida adeninadineotídeo

nm: Nanômetro

nM: Nanomolar

O²⁻: Ânion superóxido

O₂: Oxigênio molecular

OH⁻: Radical hidroxila

pH: potencial hidrogeniônico

PMSF: Fenilmetanosulfonil

Primer VHA-A F: Primer da fita molde da subunidade A

Primer VHA-A R: Primer da fita reversa da subunidade A

PVP 40: Polivinil 40.000

RNA: Ácido ribonucléico

RO: Radical alcoxi

RT-PCR: Transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SOD: Superóxido dismutase

SSC: Solução de NaCl 0,15M e citrato de sódio 0,015M

V₁: Domínio periférico de membrana da V-ATPase

V-ATPase: ATPase vacuolar

V₀: Domínio integral de membrana da V-ATPase

LISTA DE TABELAS

Quadro I. Subunidades da V-ATPase: função, localização e nomenclatura	34
Quadro II. Espécies reativas de oxigênio de interesse no estresse oxidativo.	40
Quadro III. Primers de oligonucleotídios para clonagem de cDNAs vha e fragmentos de cDNA para o macroarranjo	55
Tabela 1. Relação Na^+/K^+ em raízes (A) e folhas (B) de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp cultivar Vita 3 e Pérola, sob condição controle e de estresse salino.	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Homeostase celular estabelecida após adaptação de plantas ao estresse salino (NaCl).	24
Figura 2 Modelo da V-ATPase de <i>Vigna radiata</i> (L.) Wilczek por Li e Zhang (2004).	30
Figura 3 Modelo estrutural da V-ATPase de <i>K. daigremontiana</i> proposto por Domgmal et al., 2002.	32
Figura 4 Desenho esquemático da hibridização do macroarranjo com sondas de cDNA de folhas de plantas de <i>V. unguiculata</i> em condição controle e submetidas ao estresse salino.	55
Figura 5 Estimativa de síntese de cDNA marcado com DIG através de análise comparativa com DNA controle (DNA padrão marcado com DIG). (C) cDNA controle; (1) cDNA da amostra 1; (2) cDNA da amostra 2.	60
Figura 11 Corte longitudinal do ápice de raiz de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp cv. Vita 3, mostrando o efeito do estresse salino no volume vacuolar de células meristemáticas.	77

SUMÁRIO

RESUMO	08
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE FIGURAS	14
1 INTRODUÇÃO	
1.1 FEIJÃO DE CORDA- <i>VIGNA UNGUICULATA</i> (L.) WALP	17
1.2 SALINIDADE DOS SOLOS E SEU EFEITO EM PLANTAS	19
1.3 ADAPTAÇÃO DE PLANTAS AO ESTRESSE SALINO	22
1.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA V-ATPASE	28
...	
1.5 SUBUNIDADES DA V-ATPASE DE PLANTAS	33
1.5.1 SUBUNIDADES DA CABEÇA DO SETOR V_1	33
1.5.2 SUBUNIDADES DAS HASTES DO SETOR V_1	35
1.5.3 SUBUNIDADES DO SETOR V_0	36
1.6 REGULAÇÃO DA V-ATPASE	37
1.7 ESTRESSE OXIDATIVO	39
1.7.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE-SOD	41
1.7.2 ASCORBATO PEROXIDASE	42
1.7.3 PEROXIRREDOXINAS	43
2. OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVOS GERAIS	46
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 MATERIAL VEGETAL	48
3.2 METODOLOGIA	
3.2.1 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	48
3.2.2 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO	48
3.2.3 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS Na^+ E K^+	49
3.2.3.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO	49
3.2.3.2 DOSAGEM DE Na^+ E K^+	49
3.2.4 PREPARAÇÃO DE ENDOMEMBRANAS	49
3.2.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	50
3.2.6 ELETROFORESE E IMUNOBLOTTING	50
3.2.7 ISOLAMENTO DE TONOPLASTO	51
3.2.8 ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DA V-ATPASE	52

3.2.9 ANATOMIA DE ÁPICE DE RAIZ E ANÁLISE DO VOLUME VACUOLAR	53
3.2.10 MACROARRANJO	53
3.2.10.1 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS DO MACROARRANJO	54
3.2.10.2 SÍNTESE DE cDNA MARCADO COM DIG	58
3.2.10.3 PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO E HIBRIDIZAÇÃO DA SONDA	59
3.2.10.4 ALINHAMENTO DE SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DA SUBUNIDADE A DA V-ATPASE EM <i>MESEMBRYANTHEMUM CRYSTALLINUM</i> E <i>VIGNA UNGUICULATA</i> (L.) WALP	61
3.2.11 RT-PCR	61
3.2.11.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	62
3.2.11.2 RT-PCR	64
3.2.11.3 ELETROFORESE DO cDNA AMPLIFICADO	66
3.2.12 ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	
3.2.12.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS E RAÍZES	66
3.2.12.2 ENSAIO DA ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE	66
3.2.12.2 ENSAIO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ASCORBATO PEROXIDASE	66
4. RESULTADOS	
4.1 PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS	68
4.2 TEOR DE ÍONS Na ⁺ E K ⁺	70
4.3 ANÁLISE DOS NÍVEIS PROTÉICOS DA SUBUNIDADE A DA V-ATPASE ..	70
4.4 ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DA V-ATPASE	74
4.5 ESTUDO DA ANATOMIA DE ÁPICES RADICULARES	74
4.6 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS DAS SUBUNIDADES DA V-ATPASE	
4.6.1 ANÁLISE ATRAVÉS DE MACROARRANJO (MACRO ARRAY)	78
4.6.1.1 ALINHAMENTO DE SEQÜÊNCIAS	80
4.6.2 ANÁLISE ATRAVÉS DE RT-PCR	80
4.7 ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE	80
4.8 ATIVIDADE DA ENZIMA ASCORBATO PEROXIDASE	80
4.9 NÍVEIS PROTÉICOS DAS PEROXIRRÉDOXINA II-C E Q	86
5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÃO	101
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 FEIJÃO DE CORDA - *VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP

A espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp é vulgarmente conhecida como feijão-de-corda, feijão fradinho, feijão macassar e feijão caupi. É uma dicotiledônea que pertence à ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolinae* e gênero *Vigna* (VERCOURT, 1970).

O gênero *Vigna* *Fabaceae*, anteriormente denominado *Leguminosae*, é composto de mais de 200 espécies que são nativas de regiões quentes em todos os continentes (FERY, 2002). A maior parte dessas espécies está localizada na África, das quais 66 são consideradas endêmicas, sugerindo que o gênero *Vigna* deve ter tido sua evolução ligada ao continente africano. Esse gênero possui várias espécies que são consideradas importantes economicamente em muitos países em desenvolvimento (FERY, 2002). Entre as espécies que ocorrem na África está a *Vigna unguiculata* (L.) Walp, cuja origem e localização ainda são bastante discutidos.

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma cultura predominantemente de clima quente e pode crescer e desenvolver-se relativamente bem em condições que são totalmente inadequadas para outras espécies de feijão. O feijão caupi apresenta ciclo de vida curto, baixa exigência hídrica e capacidade para desenvolver-se em solos de baixa fertilidade. Outra característica de suma importância é a capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico através da simbiose estabelecida com bactérias do gênero *Rhizobium* nos nódulos das raízes (ANDRADE JUNIOR et al., 2004).

A espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp é uma excelente fonte de proteínas (23-25% em média) contendo todos os aminoácidos essenciais e ainda carboidratos (62%), vitaminas, minerais, grande quantidade de fibras dietéticas e baixa quantidade de lipídios (teor de óleo de 2%, em média) e ausência de colesterol. Pelo seu valor nutritivo, o feijão-caupi é cultivado principalmente para a produção de grãos

secos ou verdes, visando o consumo humano *in natura*, na forma de conserva ou desidratado. Além disso, o caupi também é utilizado como forragem verde, farinha para alimentação animal e, ainda, como adubação verde e proteção do solo. Assim, o caupi representa um alimento básico para as populações de baixa renda do Nordeste brasileiro (ANDRADE JUNIOR et al., 2004).

A área mundialmente ocupada com feijão-caupi, é de aproximadamente 12,5 milhões de hectares, estando 64% dessa área localizada (8 milhões) na parte oeste e central da África. O restante dessa área está localizado na América do Sul, América Central e Ásia, com pequenas áreas espalhadas pelo sudoeste da Europa, dos Estados Unidos e da Oceania. Os principais produtores mundiais são Nigéria, Niger e Brasil (QUIN, 1997). No Brasil, o feijão-caupi é cultivado predominantemente no sertão semi-árido da região Nordeste e em pequenas áreas na Amazônia. No Nordeste, a produção e a produtividade são de 429.375 t e 303,5 kg/ha, respectivamente. Os maiores produtores são os Estados do Ceará (159.471 t), Piauí (58.786 t), Bahia (50.249 t) e Maranhão (35.213 t), os quais também apresentam as maiores áreas plantadas (Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 1993-2001 apud ANDRADE JUNIOR et al., 2004).

A cultura do feijão-caupi é responsável pela geração de 1.451.578 empregos/ano no Brasil, com o valor de produção estimado em US\$ 249.142.582,00/ano (EMBRAPA MEIO NORTE, 2001). O cultivo do feijão-de-corda constitui atividade agrícola tradicional no Estado do Ceará, em face de sua importância sócio-econômica. Em consequência, ele é cultivado na totalidade dos municípios (Anuário, 1996), que apresenta distintas características ambientais especialmente aquelas relacionadas ao solo e ao clima (BARRETO et al., 2001).

A deficiência de água é um dos fatores mais limitantes para a obtenção de boa produtividade de feijão-caupi. Essa cultura exige um mínimo de 300 mm de precipitação pluvial para que haja produção adequada independente da prática de irrigação. As regiões cujas cotas pluviométricas oscilam entre 250 e 500 mm anuais são consideradas aptas para a implantação da cultura. Convém salientar, que o fator

limitante na deficiência de água está diretamente relacionado com a distribuição das chuvas e não com a quantidade de chuvas ocorridas no período (ANDRADE JÚNIOR et al, 2004).

Com o uso da irrigação é possível suprir a quantidade de água para o adequado crescimento e desenvolvimento do feijão-caupi. Entretanto, para o sucesso técnico e econômico dessa atividade, é necessário que se identifique quando, quanto e como irrigar, pois o uso inadequado da irrigação pode trazer sérias conseqüências como, a salinização dos solos (ANDRADE JÚNIOR et al, 2004).

1.2 SALINIDADE DOS SOLOS E SEU EFEITO EM PLANTAS

O estresse salino é um dos principais fatores que limita a produtividade de diferentes culturas agrônômicas (APSE et al., 1999). Quase um bilhão de hectares de solos agrários é afetado pela salinidade (SZABOLCS, 1994 apud MUNNS, 2002), o que representa 7% de toda a área terrestre. Dentre os 1,5 bilhões de hectares que são cultivados, cerca de 5% (77 milhões ha) são afetados por altas concentrações de sais (MUNNS et al., 1999).

A salinização crescente dos solos é principalmente devido ao processo inadequado da irrigação e aproximadamente um terço dessas áreas são afetadas pela salinidade (FLOWERS; YEO, 1997). Dessa forma, o processo de irrigação realizado inadequadamente pode trazer sérias conseqüências para o solo e, por conseguinte para o meio ambiente, perturbando o equilíbrio de ecossistemas, uma vez que alterações nos solos podem e devem interferir diretamente nas populações de plantas, que formam a cadeia primária de muitos ecossistemas. A despeito do pequeno contingente de áreas irrigadas, essas são responsáveis pela produção de aproximadamente um terço da alimentação mundial (MUNNS, 2002).

A água utilizada para a irrigação dos solos contém usualmente elevada concentração de cátions de cálcio e de magnésio e menor concentração de cátions de sódio (Na^+). Com a evaporação da água, o cálcio e o magnésio são induzidos a precipitarem no solo na forma de carbonatos e o Na^+ tornar-se o cátion

predominante na solução do solo (ASHRAF, 1999 apud SERRANO et al., 1999; JACOBSEN; ADAMS, 1958). Os sais podem afetar o desenvolvimento das plantas, mas nem todos inibem o crescimento das mesmas. A inibição do crescimento é um efeito da salinidade decorrente da presença dos íons Na^+ e Cl^- (TESTER; DAVENPORT, 2003).

A salinidade induz estresse osmótico provocado pela diminuição da atividade química da água, causando dessa forma, perda do turgor celular. Sabe-se que o crescimento das células depende da elasticidade da parede celular que por sua vez depende da pressão de turgor. Portanto, um mecanismo de ajustamento osmótico, em resposta ao estresse salino, é a produção de solutos compatíveis (osmólitos) intracelulares tais como glicerol, sacarose, trealose, prolina e betaína prevenindo assim a perda do turgor celular (MCCUE; HANSON apud SERRANO et al., 1999; YANCEY et al., 1982). Contudo, a síntese desses solutos compatíveis não-tóxicos, é energeticamente dispendiosa para a célula (TESTER; DAVENPORT, 2003) e outro agravante do estresse osmótico é também a indução do estresse oxidativo (NORAN et al., 1994 apud TESTER; DAVENPORT, 2003). Existem proteínas consideradas tolerantes ao estresse osmótico, tais como aquelas que protegem a integridade de membranas, controlam a homeostase iônica ou hídrica e o seqüestro de espécies reativas de oxigênio (BRAY, 1994; HASEGAWA et al., 2000; INGRAM; BARTELS, 1996).

Além do estresse osmótico, a salinidade causa toxicidade iônica, pois altas concentrações de Na^+ e Cl^- são deletérias à célula. Altas concentrações salinas (maiores que 0,4 M) inibem a maioria das enzimas por causar perturbação no balanço hidrofóbo-eletrostático nas forças que mantêm a estrutura das proteínas (WYN JONES; POLLARD, 1983). Entretanto, os efeitos tóxicos específicos desses íons nas células ocorrem em concentrações muito mais baixas (cerca de 0,1 M) e os alvos da toxicidade do Cl^- *in vivo* é ainda pouco conhecido. Segundo Wyn Jones e Pollard (1983) e Serrano (1996), os íons Cl^- podem interferir nos sítios aniônicos envolvidos na ligação do RNA e em metabólitos aniônicos tais como bicarbonato, carboxilatos e açúcares fosfato. Já o estudo da toxicidade do Na^+ tem sido amplamente explorado e a genética molecular de leveduras mostrou a existência de dois alvos da toxicidade fisiológica dos íons Na^+ : a Hal2 nucleotidase (GLÄSER et

al., 1993; MURGUIA et al., 1995, 1996) e a RNase MRP (DICHTL et al., 1997). A característica comum dos sítios ligantes dos íons Na^+ em nucleotidases e ribonucleases é que eles correspondem aos sítios de ligação de baixa afinidade ao magnésio (afinidade na faixa de mM) e possuem grupos fosfato e grupos carboxilatos (DICHTL et al., 1997). Ademais, de acordo com Wyn Jones e Pollard (1983) e Serrano (1996), os íons Na^+ podem ligar-se a outros sítios catiônicos como os de K^+ ou Ca^{2+} .

O mecanismo de toxicidade do Na^+ indica que a manutenção da homeostase das concentrações intracelulares de cátions, principalmente Na^+ e K^+ , são de importância primordial na tolerância de organismos ao estresse salino. Os transportadores de íons bem como sua regulação desempenham papéis fisiológicos cruciais como a manutenção da concentração intracelular ótima de íons. Em geral, com exceção de archaebactérias halófitas, essa faixa consiste de concentrações relativamente altas de K^+ (10^{-3} M) e concentrações relativamente baixas de Na^+ (10^{-2} M), de prótons (10^{-7} M) e de cálcio (10^{-7} M). Um pH neutro pode ser necessário para a estabilidade de proteínas, além disso, uma relação alta de magnésio/cálcio favorece a solubilidade de compostos fosfatados. A elevada concentração intracelular do K^+ em relação à do Na^+ pode ser explicada pela menor interação de K^+ com os sítios de ligação de baixa afinidade ao magnésio e que são ocupados por Na^+ e Li^+ (SERRANO et al., 1999).

Segundo Munns (1993, 2002), os prejuízos causados especificamente pelo Na^+ estão associados à acumulação desse íon nas folhas levando a necrose das mais velhas, a partir das extremidades e margens alcançando posteriormente toda a sua extensão. A redução do crescimento e da safra ocorre como resultado do menor tempo de vida de folhas individuais, reduzindo assim a produtividade de culturas. O prejuízo devido ao Na^+ depende da sua taxa de acumulação dentro das folhas e da sua compartimentalização dentro de tecidos e de células foliares (TESTER ; DAVENPORT, 2003).

Alguns efeitos da elevada concentração de Na^+ na fisiologia das plantas, são ainda resultado da deficiência de outros nutrientes (SILBERBUSH; BEN-

ASHER, 2001), ou de interações com outros fatores ambientais tais como seca, que potencializa a toxicidade do Na^+ . A deficiência de outros nutrientes pode ocorrer especificamente porque elevadas concentrações de Na^+ inibem a captação de outros nutrientes através da interferência com transportadores na membrana plasmática de raízes, tais como canais de íons seletivos para K^+ , pela inibição do crescimento de raízes pelo efeito osmótico do Na^+ e por causa dos efeitos deletérios do Na^+ na estrutura do solo (WILD, 1988, apud TESTER; DAVENPORT, 2003).

Há plantas que toleram altas concentrações salinas no solo melhor que outras, e esta variabilidade ocorre entre os maiores grupos de plantas como, por exemplo, em grupos taxonômicos bem distintos, entre espécies estritamente relacionadas, em diferentes variedades de uma mesma espécie ou entre indivíduos dentro de uma linha varietal. Apesar das diferenças na adaptação de plantas ao estresse salino, estudos bioquímicos mostraram que as enzimas de plantas halófitas (plantas adaptadas à habitats salinos) não são mais tolerantes às altas concentrações de NaCl que as enzimas de plantas não-halófitas (glicófitas) (FLOWERS et al., 1977; GREENWAY; OSMOND, 1972).

1.3 ADAPTAÇÃO DE PLANTAS AO ESTRESSE SALINO

A tolerância ao sal é freqüentemente avaliada como a porcentagem de produção de biomassa em condição salina comparada à biomassa em condição controle em determinado período de tempo. São encontradas diferenças drásticas na tolerância ao sal entre diferentes espécies de plantas. A exposição de diferentes plantas a 200 mM de NaCl em função dos diferentes graus de tolerância induz reduções de peso seco de apenas 20% no caso da beterraba, espécie mais tolerante e de 60% no algodão, espécie moderadamente tolerante ao passo que espécies mais sensíveis como soja podem morrer (GREENWAY; MUNNS, 1980). Enquanto, uma halófito como *Suaeda maritima* pode crescer nessas condições com uma taxa ótima de crescimento (FLOWERS et al., 1977, 1986; MUNNS, 2002). Dessa forma, a análise da fisiologia da resposta e mecanismos de adaptação das plantas ao estresse salino pode e deve fornecer boas informações sobre o processo de

adaptação ao sal e a identificação de fatores que determinam a sensibilidade ou a tolerância de uma determinada espécie.

Os mecanismos de tolerância ao sal em células vegetais têm sido amplamente descritos na perspectiva ecológica e fisiológica e através de aspectos biológicos celulares e moleculares (FLOWERS et al. 1977; HASEGAWA et al., 2000, MIMURA et al., 2003). Segundo Mimura et al. (2003), a tolerância de células de plantas ao estresse salino é principalmente devido à combinação de três diferentes mecanismos:

(1) ajustamento osmótico do citoplasma devido ao acúmulo de solutos compatíveis, tais como betaína, prolina ou álcool de carboidratos;

(2) exclusão do sal da célula através da membrana plasmática usando transportadores de íons, tais como contra-transportadores Na^+/H^+ (ALLEN et al., 2000; DUPON, 1992; MIMURA et al., 2003; SHI et al., 2000), com o objetivo de minimizar a concentração de sal na planta;

(3) acúmulo de sal nos vacúolos usando transportadores no tonoplasto tais como contra-transportadores Na^+/H^+ ou canais Cl^- (BLUMWALD & POOLE, 1987; GABARINO & DUPON, 1988; GAXIOLA et al., 1999).

A Figura 1 mostra os mecanismos envolvidos na manutenção da homeostase celular estabelecida após adaptação de plantas ao estresse salino (NaCl) (HASEGAWA et al., 2000). O acúmulo de íons no vacúolo serve não somente para evitar o aumento da concentração iônica no citoplasma, mas ainda para aumentar a osmolaridade celular prevenindo o estresse osmótico (MIMURA et al., 2003). O vacúolo é uma organela presente em células de animais (protozoários e esponjas), de fungos (leveduras), de algas e de plantas. Em plantas, essa organela é diversificada no tocante à forma, tamanho, conteúdo e dinâmica funcional (MARTY, 1999).

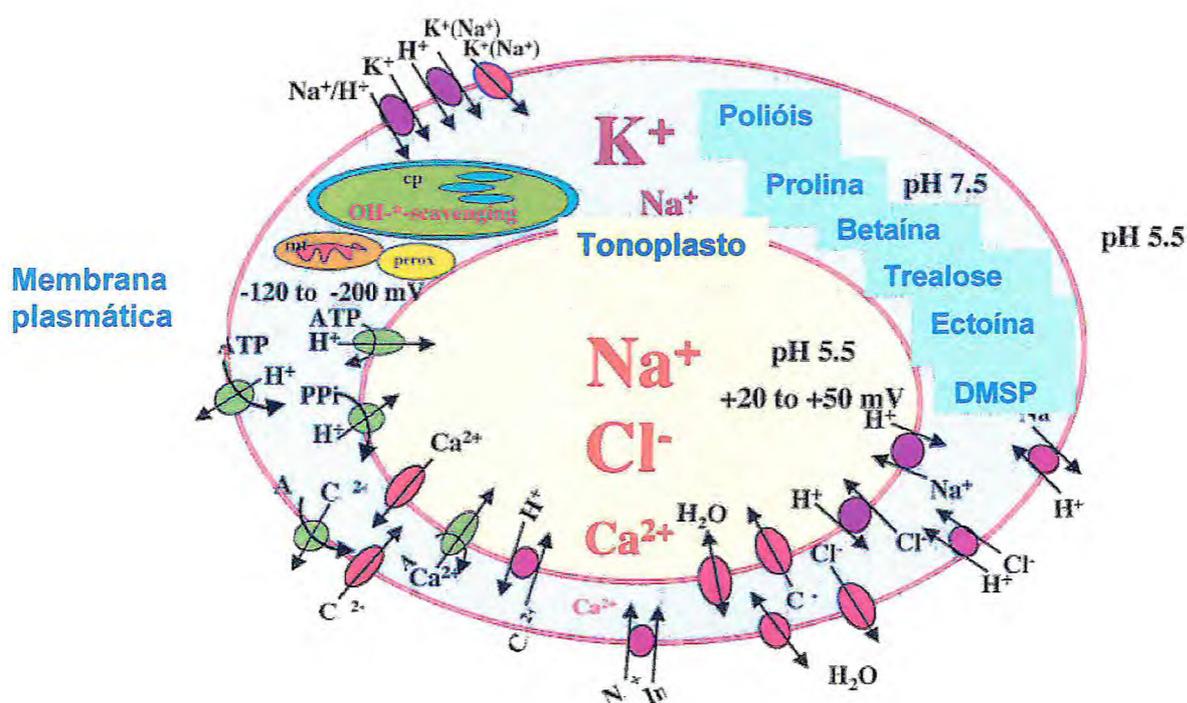


Figura 1. Homeostase celular estabelecida após adaptação de plantas ao estresse salino (NaCl). Estão indicados: compartimentação de osmólitos e íons no citoplasma e vacúolo; as proteínas transportadoras responsáveis pela homeostase do Na^+ e Cl^- ; canais de água; e o potencial eletroquímico através da membrana plasmática e do tonoplasto. As organelas que têm importância no seqüestro de EROS estão indicadas como: cloroplasto (cp), mitocôndria (mt), e peroxissomos (perox)
 Fonte: HASEGAWA et al. (2000).

Em células de plantas imaturas e não diferenciadas encontram-se, numerosos e pequenos provacuólos com predominância do material citoplasmático em relação ao sistema de endomembranas (MARTY, 1978). Os pequenos provacuólos parecem ser provenientes de vesículas originárias do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi. Na maioria das células de tecidos vegetativos de plantas, um grande vacúolo central ocupa a maior parte do volume celular e exerce um papel essencial na fisiologia da planta (MARTY, 1999).

O vacúolo de células vegetais contém a maior parte dos íons orgânicos e de metabólitos que geram uma pressão osmótica levando ao acúmulo de água no seu interior e facilitando a expansão celular. A regulação da pressão osmótica depende do transporte de açúcares, de íons e de outros metabólitos através da membrana plasmática e do tonoplasto bem como das velocidades de quebra e de síntese de polímeros vacuolares (TAIZ, 1992). Além do papel do vacúolo na expansão celular e conseqüente crescimento das células vegetais, ele exerce outras importantes funções, tais como:

1. Acúmulo e armazenamento de metabólitos como, por exemplo, açúcares, proteínas, ácidos orgânicos e nutrientes temporários (MAESHIMA et al., 1996);

2. Regulação das concentrações citosólicas de íons inorgânicos como nitrato e Ca^{2+} e sua redistribuição para o citosol de acordo com as necessidades celulares, sendo essa organela considerada um dispositivo homeostático (MAESHIMA et al., 1996);

3. Compartimentação de substâncias tóxicas (glicosídeos cianogênicos e alcalóides) que podem ser liberadas para o citoplasma quando a planta sofre injúria ou ataque por insetos ou outros animais (MAESHIMA et al., 1996);

4. Hidrólise e reciclagem de compostos celulares pela ação de enzimas presentes no seu interior (proteases, ribonucleases, fosfodiesterase, glicosidases, fitases e fosfatases alcalinas) (MAESHIMA et al., 1996);

A membrana vacuolar, também denominada de tonoplasto, possui uma estrutura básica comum a todas as membranas celulares, consistindo de uma bicamada lipídica contínua na qual proteínas são inseridas. Nela estão localizados os sistemas de

transporte de uma variedade de substâncias (sistemas primários e secundários), sendo dessa forma considerada uma membrana funcional e altamente organizada (MAESHIMA, 2001).

Os sistemas primários são capazes de gerar um gradiente eletroquímico ao transportar íons contra um gradiente de concentração utilizando-se da energia liberada na quebra de ligações covalentes. Já os sistemas secundários, transportam íons e substâncias através da membrana, sem envolver a quebra de ligações covalentes, mas dependendo do gradiente eletroquímico de H^+ gerado na membrana pelos sistemas primários (LOGAN et al., 1997). As bombas vacuolares de H^+ (H^+ -ATPase e H^+ -PPase), transportadores ativos primários, utilizam a energia proveniente da quebra de ligações de alta energia das moléculas de ATP e PPi, respectivamente, para transportar H^+ para o interior do vacúolo. Dessa forma, um gradiente de prótons ($\Delta\mu H^+$) é gerado, o qual tem como componentes a variação de pH (ΔpH) e a variação do potencial de membrana ($\Delta\Psi$). A entrada de prótons realizada por essas bombas gera um potencial elétrico de membrana positivo do lado interno em relação ao lado externo do tonoplasto, bem como uma variação de pH, onde a concentração de H^+ é maior no interior do vacúolo em relação ao meio citoplasmático. O gradiente gerado pelas bombas de prótons fornece energia para os transportadores secundários (MAESHIMA, 2001).

Os sistemas de contra-transporte foram primeiramente descritos por West e Mitchell (1974) e estão amplamente difundidos tanto em células procarióticas como em células eucarióticas (BLUMWALD; AHARON; APSE, 2000; PADAN et al., 2001).

Os sistemas secundários consistem de vários transportadores de açúcares, de ácidos orgânicos, de íons e de outros metabólitos. Existem dois tipos de transporte secundário: simporte e antiporte. No transporte simporte, as duas substâncias se movem na mesma direção através da membrana e a proteína envolvida nesse transporte é denominada transportador tipo simporte. O transporte antiporte refere-se ao transporte acoplado, no qual o movimento a favor do gradiente de prótons impulsiona o transporte ativo de um soluto na direção oposta e é facilitado pela proteína denominada transportador tipo antiporte (contra-transportador) (TAIZ; ZEIGER, 1998).

Os contra-transportadores Na^+/H^+ são proteínas transportadoras que movem íons Na^+ para fora da célula ou para o interior de organelas em troca de íons H^+ exercendo papel importante na homeostase celular do pH e da concentração de Na^+ (BLUMWALD; AHARON; APSE, 2000; PADAN et al., 2001; WIEBE et al., 2001).

Nos últimos anos, avanços significativos foram feitos para esclarecer a estrutura e a função dos contra-transportadores Na^+/H^+ bem como os mecanismos essenciais das reações de troca e sua regulação (BLUMWALD; AHARON; APSE, 2000; HASEGAWA et al., 2000; PADAN et al., 2001). Os genes que codificam os contra-transportadores Na^+/H^+ foram clonados em células de vários organismos: bactérias, leveduras, animais e plantas (COUNILLON; POUYSSEGUR, 2000; GAXIOLA et al., 1999; PADAN et al., 2001).

As evidências de que os contra-transportadores Na^+/H^+ exercem papel crucial na tolerância de plantas ao estresse salino têm aumentado nos últimos anos (ZHAO et al., 2006). Esses contra-transportadores, presentes na membrana vacuolar e plasmática, agem removendo íons Na^+ do citoplasma e transportando-os para o interior do vacúolo ou para fora da célula e dessa forma, previnem a toxicidade celular decorrente da acumulação excessiva de Na^+ (BLUMWALD; AHARON; APSE, 2000; HASEGAWA et al., 2000). Foram observados aumentos na tolerância de várias plantas ao estresse salino em decorrência da superexpressão do gene que codifica a proteína do contra-transporte Na^+/H^+ de tonoplasto (*AtNHX1*) em *Arabidopsis*, tomate, *Brassica*, trigo e arroz (APSE et al. 1999; FUKUDA et al. 2004; OHTA et al. 2002; XUE et al. 2004; ZHANG; BLUMWALD, 2001; ZHANG et al. 2001;). Esses resultados indicam que a expressão do gene do contra-transportador Na^+/H^+ pode ser fundamental para a tolerância de plantas e o suporte para essa evidência foi adquirido a partir de estudos de super-expressão do gene *Atnhx1* em plantas e leveduras (APSE et al., 1999; DARLEY et al., 2000; QUINTERO et al., 2000; VENEMA et al., 2002; ZHANG & BLUMWALD, 2001; ZHANG et al., 2001). Entretanto, até agora os mecanismos essenciais do aumento da tolerância ao sal em plantas transformadas (contra-transportadores Na^+/H^+) não estão claros (TESTER; DAVENPORT, 2003).

Apesar de existirem vários tipos de transportadores nas membranas celulares, as bombas de prótons ocupam uma posição proeminente dentre todos os

transportadores, pois sem a força próton motora primária gerada para energizar e possibilitar o transporte de substâncias via carreadores ou canais de íons, todas as outras formas de transporte cessariam. Das três diferentes bombas de prótons das plantas: F-ATPase, V-ATPase e P-ATPase, a H⁺-ATPase vacuolar (V-ATPase) é a mais complexa em relação à composição de subunidades (DIETZ et al., 2001; LÜTTGE; RATAJCZAK, 1997; SZE, 1999).

1.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DA V-ATPASE

A V-ATPase é uma bomba com diversas e surpreendentes funções nos eucariotos. O complexo da V-ATPase parece ser conservado em todos os eucariontes (STEVENS; FORGAC, 1997). Em plantas, ela foi localizada no tonoplasto e em outras membranas do sistema secretor, como no retículo endoplasmático (RE), no complexo golgiense e em pequenas vesículas bem como na membrana plasmática (DIETZ et al., 2001; SZE, 1999; LÜTTGE; RATAJCZAK, 1997).

Apesar da descoberta da V-ATPase ter sido realizada há vinte anos (SZE, 1985), suas funções nas plantas ainda não foram totalmente elucidadas. Os mutantes com deficiência na V-ATPase são ferramentas úteis para desvendar as funções da V-ATPase *in vivo*. O primeiro mutante de V-ATPase em plantas foi o mutante *det3*, que mostrou uma redução na quantidade da subunidade C e na atividade V-ATPásica e foi destituido quando crescido no escuro (SCHUMACHER *et al.*, 1999). Além disso, o fechamento dos estômatos induzidos por altas concentrações externas de íons cálcio foi abolido nesse mutante (ALLEN *et al.*, 2000). Esses estudos mostraram que as funções da V-ATPase estão intimamente integradas com crescimento, desenvolvimento e sinalização de células-guarda. Ademais, foi sugerido que o gradiente eletroquímico de prótons é importante na distribuição de proteínas (MATSUOKA, 2000). Demonstrou-se também a necessidade do setor integral de membrana V_o na fusão de vesículas em leveduras, sugerindo que esse setor de membrana tem papel fundamental na fusão de membranas durante a formação do vacúolo central (PETERS et al, 2001; WICKNER; HAAS, 2000). Apesar da diversidade de funções, o papel preponderante da V-ATPase é acidificar o vacúolo, gerando energia

para transporte de íons e de metabólitos, com repercussão na expansão e no turgor celular.

A V-ATPase consiste de várias subunidades polipeptídicas que estão localizadas em dois grandes domínios, um domínio periférico de membrana (V_1) e um domínio integral de membrana (V_0). Estudos com microscopia eletrônica usando técnica de coramento negativo revelaram uma estrutura formada por uma cabeça e uma haste para o domínio periférico de membrana da V-ATPase de *Mesembryanthemum crystallinum* (KLINK; LÜTTGE, 1991), *Daucus carota* (LEE TAIZ; TAIZ, 1991), *Glycine max* (MOORRÉ et al., 1991), *Beta vulgaris* (GETZ; KLEIN, 1995) e *Vigna radiata* (LI; ZHANG, 2004). Essa estrutura é muito semelhante à F-ATP sintase e a H^+ -ATPase de archaea (KLINK; LÜTTGE, 1991; LEE; TAIZ, 1991; NELSON; TAIZ, 1989). Todas essas bombas evoluíram provavelmente a partir de um protótipo ancestral, caracterizada pela simetria trímica em suas partes centrais. A cabeça da V-ATPase é composta de um hexâmero de subunidades alternadas entre a subunidade A e B. Um anel de subunidades c na membrana se estende através da subunidade D para a cabeça. Apesar das similaridades entre V-, A- e F-ATPases, existem diferenças básicas na presença de subunidades adicionais, regulação e sensibilidade à inibidores. Em função do tipo de ATPase, uma ou várias hastes conectam a parte associada da membrana (V_0 ou F_0) à estrutura da cabeça (LI; ZHANG, 2004).

A estrutura sugerida para a V-ATPase de plantas, até o momento, é de 12 diferentes subunidades e dessa forma, muito parecida com a estrutura da V-ATPase de leveduras (DIETZ et al., 2001; SZE et al., 2002). Foi proposta a estequiometria de $A_3B_3CDEFG_2Hac_4c'_1c''_1d$ para o holocomplexo da V-ATPase (POWELL et al., 2000). Kluge et al (2003) afirmaram ainda que apesar dos estudos de análise estrutural da V-ATPase terem avançado e que a identificação de genes tenha sido realizada, não se pode excluir a possibilidade de existir subunidades adicionais ou fatores de agrupamento que possam ser identificados como constituintes do complexo da V-ATPase. Além disso, subunidades adicionais podem ter sido perdidas durante o processo de purificação ou não estarem visíveis no coramento do gel (RATAJCZAK, 2000).

Li e Zhang (2004) purificaram a V-ATPase de hipócotilos de plantas de *Vigna radiata* (L.) Wilczek e analisaram sua estrutura através de microscopia eletrônica. A V-ATPase purificada consistiu de 12 subunidades com massas moleculares aparentes de 100, 68, 57, 51, 44, 40, 38, 37, 32, 16, 13 e 12 kDa. Somente parte dessas subunidades foram identificadas, como aquelas de massa moleculares de 68-, 57-, 38-, 37-, 32-, e 16- kDa que corresponderam respectivamente às subunidades A, B, E₁, E₂, D e c (onde E₁ e E₂ são isoformas da subunidade E) (MATSUURA-ENDO et al. 1990; KAWAMURA et al. 2000). Imagens de microscopia eletrônica de domínios V₁ isolados revelaram a presença de subunidades A, B e E, sugerindo que a subunidade E esteja localizada na haste central. A figura 2 mostra o modelo da V-ATPase de *Vigna radiata* de acordo com os dados estruturais obtidos por Li e Zhang (2004).

O número de hastes presentes na região periférica é uma das questões mais frequentemente discutidas sobre a estrutura da V-ATPase. Projeções bidimensionais da V-ATPase de *C. fervidus* e de vesículas bovinas de clatrina sugerem que há três hastes periféricas e simétricas além da haste central (UBBINK-KOK et al. 2000; WILKENS et al. 1999). O modelo estrutural proposto para a V-ATPase de *K. daigremontiana* derivado de conhecimentos bioquímicos e dados estruturais, obtidos através de projeções tridimensionais, mostra que a haste central está rodeada por 3 hastes periféricas de diferentes tamanho e forma (Figura 3) (DOMGALL et al. 2002). Já o modelo estrutural proposto para a V-ATPase de *Vigna radiata* sugere a existência de pelo menos 2 hastes periféricas em torno da haste central, vez que o número exato de hastes não pôde ser calculado por causa do número limitado de orientações das partículas no filme de carbono (LI; ZHANG, 2004).

De acordo com a nomenclatura sugerida por Sze et al. (2002), as subunidades da V-ATPase são denominadas VHA-A até VHA-H para as subunidades hidrofílicas que compõem o setor V₁ e VHA-a, VHA-c, VHA-d e VHA-e para as subunidades associadas à membrana.

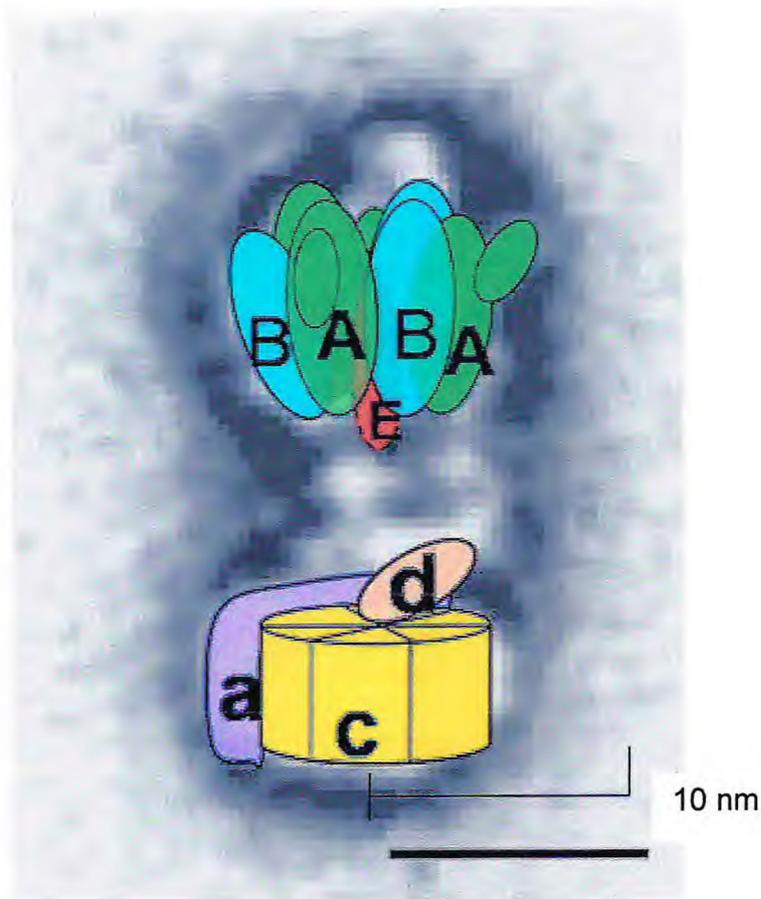


Figura 2. Modelo da V-ATPase de *Vigna radiata* (L.) Wilczek por Li e Zhang (2004). Organização das subunidades overlaid, ordenada pela projeção da visão lateral da V-ATPase. A figura mostra o esquema da posição A_3B_3 da parte da cabeça (setor V_1), a subunidade E e o setor a membrane V_o que incluem as subunidades a, c e d. As subunidades remanescentes não puderam ser posicionadas utilizando os resultados obtidos pelos autores.

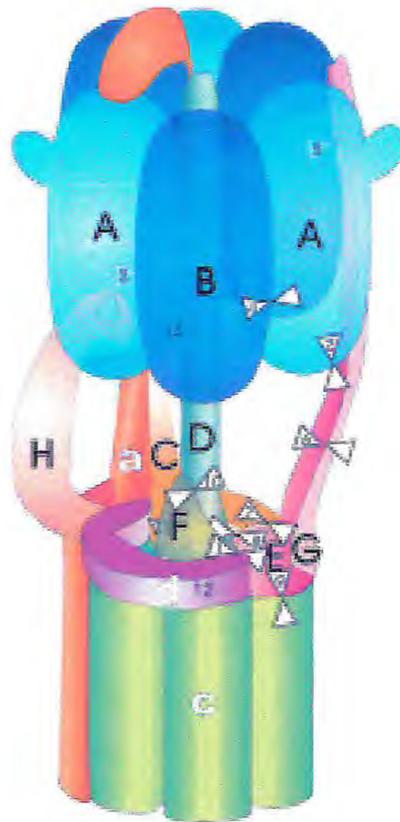


Figura 3. Modelo estrutural da V-ATPase de *K. daigremontiana* proposto por Domgmal et al., 2002. Os pares de triângulos brancos indicam diferentes reações cruzadas entre as subunidades da V-ATPase. As diferentes cores representam o subcomplexo (AB)3 (azul), o rotor (verde) e o componente estator (vermelho) (DOMGMALL et al., 2002).

Acredita-se que a V-ATPase funciona como um modelo molecular análogo à F-ATP sintase. De acordo com esse modelo, todas as hastes periféricas e à cabeça formam o estator, enquanto um anel de seis ou mais subunidades c juntamente com as subunidades que se projetam a partir do proteolípido para o centro da cabeça, representam o rotor. Uma mudança conformacional gerada pela hidrólise do ATP na subunidade A é convertida numa rotação da haste (subunidade D e F) que causa uma rotação no anel de subunidades c inserido na membrana. Os prótons são vetorialmente translocados do lado citoplasmático para o lúmen do vacúolo (KLUGE et al., 2003)

1.5 SUBUNIDADES DA V-ATPASE DE PLANTAS

A V-ATPase consiste de várias subunidades polipeptídicas que estão localizadas em dois grandes domínios, um domínio periférico (V_1) e um domínio integral de membrana (V_0). O quadro I mostra as subunidades da V-ATPase de plantas com suas respectivas funções, nomenclatura e localização.

1.5.1 SUBUNIDADES DA CABEÇA DO SETOR V_1

SUBUNIDADE A (VHA-A)

A subunidade A da V-ATPase contém um sítio de ligação para a nucleotídeo e a ligação dessa subunidade a análogos de adenina (7-cloro-4-nitrobenzeno-2oxa-1,3-diazole, 5' isotiocianato ou N-etilmaleimide), inibe a atividade de hidrólise. Dessa forma, a subunidade A parece ser a subunidade catalítica da V-ATPase e mostra seqüência similar à subunidade catalítica da F-ATPase (β). A massa molecular calculada a partir da seqüência de aminoácidos varia na faixa de 68,5 a 68,8 kDa em diferentes espécies de plantas (RANDALL; SZE, 1987; TZENG et al, 1992; WANG; SZE, 1985).

Subunidade	Função	Nomenclatura	kDa	Proteína
Setor Periférico V₁				
A	Ligação com ATP- função catalítica-	VHA-A	68	Periférica
B	Ligação com ATP- função não-catalítica	VHA-B	54	Periférica
C	Estabilidade do setor V ₁	VHA-C	42	Periférica
D	Forma a haste central, função de acoplamento	VHA-D	29	Periférica
E	Forma a haste periférica ou central	VHA-E	26	Periférica
F	Contato de ligação entre o setor V ₀ e V ₁	VHA-F	14	Periférica
G	Acoplamento do setor V ₁ e V ₀	VHA-G	12	Periférica
H	Função regulatória	VHA-H	50	Periférica
Setor de membrana V₀				
A	Acoplamento e construção do complexo	VHA-a	89-95	Integral de membrana
C	Translocação de prótons	VHA-c	16	Integral de membrana
C'	Proteolípídio similar ao c	VHA-c''	18	Integral de membrana
d	Estabilidade e montagem do setor V ₀	VHA-d	40	Integral de membrana
E		VHA-e	8	Integral de membrana

Quadro I. Subunidades da V-ATPase: função, localização e nomenclatura.

Fonte: SZE et al. (2002)

SUBUNIDADE B (VHA-B)

A subunidade B da V-ATPase é semelhante a subunidade α da F-ATPase. Ela contém sítio de ligação para nucleotídeo, mas a sua ligação com um análogo de ATP não inibe a hidrólise do substrato (ATP). Dessa forma, a subunidade B possui sítio de ligação ao substrato, mas não é uma subunidade catalítica. A massa molecular deduzida é de 53,7 a 54,7 kDa (RATAJCZAK, 2000).

1.5.2 SUBUNIDADES DAS HASTES DO SETOR V_1

SUBUNIDADE C (VHA-C)

A massa molecular aparente da subunidade C está na faixa de 37 a 52 kDa. A sua função ainda não foi claramente elucidada, mas parece estar envolvida na estabilização do setor V_1 (RATAJCZAK, 2000).

SUBUNIDADE D (VHA-D)

A análise estrutural da subunidade D em levedura revelou semelhança com a da subunidade γ da F-ATPase a despeito das diferenças nas respectivas seqüências. A massa molecular dessa subunidade em *Arabidopsis thaliana* é de 29,1 kDa e parece estar envolvida na conexão do setor V_0 ao setor periférico V_1 através do acoplamento da hidrólise de ATP ao transporte de H^+ (RATAJCZAK, 2000).

SUBUNIDADE E (VHA-E)

A clonagem de genes da subunidade E de plantas revelou similaridades de seqüência com a proteína Vma7 em leveduras. A sua função ainda não está esclarecida (RATAJCZAK, 2000).

SUBUNIDADE F (VHA-F)

A seqüência de aminoácidos da subunidade F da V-ATPase de plantas ainda não foi elucidada. Contudo, a presença em várias espécies de um polipeptídeo com massa molecular aparente de 13 kDa pode estar relacionada com essa

subunidade. No tocante a função da subunidade F ela também não está ainda bem compreendida (RATAJCZAK, 2000).

SUBUNIDADE G (VHA-G)

A subunidade G exibe significativa similaridade de seqüência com a subunidade b a F-ATPase. Em analogia à subunidade b, a subunidade G da V-ATPase é um forte candidato para ser a parte periférica da haste que pode estar envolvida no acoplamento da hidrólise de ATP e o transporte de H^+ (RATAJCZAK, 2000).

SUBUNIDADE H (VHA-H)

A subunidade H é dispensável na função de agrupamento de subunidades, mas é requerida para a função catalítica da V-ATPase. Estudos sugerem que a subunidade H liga o setor V_1 ao setor V_0 e ativa a V-ATPase (KLUGE et al., 2003).

1.5.3 SUBUNIDADES DO SETOR V_0

SUBUNIDADE A (VHA-A)

A subunidade a tem massa molecular de cerca de 90 kDa e é a maior subunidade da ATPase. A VHA-a tem uma estrutura quimérica com uma parte hidrofílica aminoterminal menos conservada e uma parte hidrofóbica C-terminal, mais conservada. A parte C-terminal possui de 6 a 9 domínios transmembranas e contém resíduos de aminoácidos envolvidos na translocação vetorial de H^+ através da membrana (KLUGE et al., 2003). A presença da subunidade VHA-a no complexo funcional da V-ATPase de plantas é ainda discutível e controverso (RATAJCZAK, 2000). Li e Sze (1999) sugerem ainda que VHA-a é requerida para o agrupamento do complexo da V-ATPase mas que está ausente no complexo funcional.

SUBUNIDADE C (VHA-C)

A subunidade c é o principal componente do domínio V_0 . Os genes de várias plantas foram clonados e as seqüências de aminoácidos deduzidas revelaram

polipeptídeos exibindo massas moleculares entre 16,6 e 16,7 kDa. A subunidade c é uma proteína altamente hidrofóbica contendo quatro domínios de membrana e parece estar envolvida no transporte de H^+ (RATAJCZAK, 2000).

Em leveduras, c é codificada por uma pequena família de genes denominada c, c', c''. Um gene homólogo à subunidade c' foi identificado no genoma de *Arabidopsis*, mas nenhum gene codificando o homólogo c'' foi encontrado (DIETZ et al., 2001; SZE et al., 2002).

SUBUNIDADE D (VHA-D)

A subunidade d foi identificada como uma subunidade intimamente associada ao setor V_o embora ela seja destituída de domínio transmembrana. Em leveduras, essa subunidade pode ser dissolvida do setor V_o através de tratamento com sais caotrópicos (BAEUERLE, 1993). As seqüências VHA-d são altamente conservadas entre as espécies. Em VHA-d de *M. crystallinum*, 41,5% de todas as posições dos aminoácidos são idênticas ao VMA6 (gene em leveduras) (KLUGE et al., 2003).

SUBUNIDADE E (VHA-E)

A subunidade e é a menor subunidade da V-ATPase e foi identificada primeiro em grânulos de cromafina de *Bos taurus* (LUDWIG et al., 1998). Apesar do baixo grau de identidade de aminoácidos entre VHA-e de todas as espécies, VHA-e é caracterizada por duas hélices na membrana altamente conservadas.

1.6 REGULAÇÃO DA V-ATPASE

A regulação fina e precisa da V-ATPase é extremamente importante para o desenvolvimento da planta e para adaptação ao estresse. A atividade da V-ATPase pode ser alterada por vários mecanismos, entretanto, um modelo conclusivo para essa regulação permanece ainda desconhecido (DIETZ et al., 2001). A V-ATPase pode ser regulada, principalmente através da sua expressão (protéica e/ou transcricional) ou através da modulação de sua atividade. Existem vários trabalhos que mostram a indução da expressão dos genes das subunidades da V-ATPase em

resposta a estresses ambientais (GOLLDACK; DIETZ, 2001; KLUGE et al., 2003, LÖW et al., 1996; OTOCH et al., 2001; RATAJCZAK, 1994; ROCKEL; LÜTTGE; RATAJCZAK, 1998; TSIANTIS et al., 1996; WANG; LÜTTGE; RATAJCZAK, 2001).

Particularmente, tal resposta já é bem conhecida em plantas mais tolerantes ao sal quando submetidas à alta salinidade (KLUGE et al., 2003). Além da regulação em longo prazo através da expressão do transcrito ou da proteína, a atividade V-ATPásica está sujeita ainda à regulação bioquímica que pode ser rápida ou lenta. Os principais fatores que afetam a atividade V-ATPásica são :

- pH e íons: A atividade da V-ATPase é estimulada por Cl^- e revela atividade máxima no pH neutro;

- adenilatos e fosfatos: A atividade da enzima é estimulada pela concentração do seu substrato (ATP) e inibida pelos produtos da hidrólise do ATP, ADP e fosfato inorgânico. Isso leva ao seguinte efeito: quando a concentração citosólica do ATP é alta, as concentrações citosólicas de ADP/Pi são geralmente baixas, e vice-versa;

- formação de pontes dissulfeto reversíveis: A subunidade A possui dois resíduos de cisteína, C254 e C532, que estão envolvidos na formação da ponte dissulfeto regulatória (FENG; FORGAC, 1994). Agentes modificadores de grupos SH, como glutatona oxidada, cloreto de mercúrio, peróxido de hidrogênio e ausência de Ditioneitol (DTT) durante o isolamento de vesículas de tonoplasto induzem inativação da V-ATPase (DIETZ et al., 2001; OLIVEIRA, 1999).

- efeito de lipídios: Mudanças na composição lipídica de endomembranas, têm implicações na atividade da V-ATPase. Quando essa enzima é purificada e delipidada, ela não possui ou possui somente uma pequena atividade de hidrólise.

A V-ATPase é importante como uma enzima de manutenção (“house-keeping”) da homeostase iônica do citosol e do metabolismo celular. Por outro lado, sob condições de estresse ambiental, a V-ATPase age como uma enzima de resposta ao estresse, sofrendo mudanças moderadas na expressão de subunidades e modulações na sua estrutura. Por está envolvida nas adaptações eco-fisiológicas ao nível molecular,

a V-ATPase foi considerada uma “eco-enzima” (LÜTTGE; FISCHER-SCHLIEBS; RATAJCZAK, 2001).

1.7 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio possui potencial redox positivo de + 1,299V, dessa forma age como um agente oxidante, sendo capaz de oxidar a maior parte dos componentes celulares. Entretanto, devido ao seu estado inerte, geralmente necessita ser ativado, antes que tais reações de oxidação possam ocorrer. Através da aquisição de 4 elétrons pelo dióxigênio molecular (O_2) são produzidos ânions superóxidos, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil e água. Os derivados de oxigênio produzidos pela redução incompleta são chamados de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Quadro II). Elas têm reatividade muito maior que o O_2 e podem causar prejuízos em macromoléculas, membranas e DNA. Por outro lado, podem ainda agir como sinais modulando a expressão de genes, as atividades enzimáticas ou as reações de defesa. Dessa forma, a reatividade do oxigênio tem que ser controlada para manter o metabolismo celular em um estado funcional (PANDA; KHAN, 2002).

As cadeias transportadoras de elétrons nas plantas, com seus respectivos transportadores ativados em função do estado redox, são consideradas como as fontes mais prováveis para a formação intracelular de EROS. Dessa forma, as maiores fontes de EROS provenientes do metabolismo das plantas são transportes de elétrons envolvidos nos processos fotossintéticos, fotorrespiratórios e respiratórios (SCANDALIOS, 2005; TESTER; DAVENPORT, 2003). As espécies reativas de O_2 (EROS) são produzidas nas células tanto sob condição de estresse como sob condição não estressante. As plantas possuem sistemas de defesa bem desenvolvidos para combater as EROS, envolvendo a limitação da sua formação e a sua remoção. Sob condições não-estressantes, a formação e a remoção dos EROS estão em equilíbrio. O estresse oxidativo é caracterizado pela superprodução de espécies de oxigênio altamente reativas e pode ser induzido por uma ampla variedade de fatores ambientais, tais como estresse salino, estresse osmótico, invasão de patógenos, ação de herbicidas, dentre outros. Os estresses abióticos agem como catalisadores nas reações

Nome	Notação	Alguns comentário e fontes básicas
Oxigênio molecular	$O_2; {}^3\Sigma$	Forma comum do gás dióxigênio
Oxigênio <i>singlet</i>	${}^1O_2; {}^1\Delta$	Fotoinibição; radiação UV; reações de transferência de elétrons no Fotossistema II (OS II) (cloroplasto)
Ânion superóxido	$O_2^{\bullet-}$	Formado em muitas reações de fotooxidação (flavoproteínas, cicling redox; reação de Mehler em cloroplastos; reações de transferência de elétrons; fotorrespiração glioxissomal; atividade peroxissomal; fixação de nitrogênio; reações de O_3 e OH^{\bullet} no espaço apoplástico; oxidação de xenobióticos
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Formado a partir da dismutação do $O_2^{\bullet-}$; fotorrespiração; β -oxidação; decomposição do $O_2^{\bullet-}$ induzida por próton; defesa contra patógenos.
Radical hidroxil	OH^{\bullet}	Decomposição de O_3 no espaço apoplástico; defesa contra patógenos; reações de H_2O_2 com $O_2^{\bullet-}$ (Haber-Weiss); reações de H_2O_2 com Fe^{2+} (Fenton); altamente reativo com todas as macromoléculas.
Radical Peridoxil	O_2H^{\bullet}	Forma protonado do $O_2^{\bullet-}$; reações de O_3 e OH^{\bullet} no espaço apoplástico.
Ozônio	O_3	Radiação UV ou descarga elétrica na estratosfera; reações envolvendo a combustão de produtos de combustíveis fósseis e radiação UV na troposfera.

Quadro II. Espécies reativas de oxigênio de interesse no estresse oxidativo.

Fonte: SCANDALIOS (2005)

de produção de radicais livres: radical superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH^\cdot) e moléculas tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio *singlet* (1O_2), ozônio e radicais alcoxi (RO). (BAKARDJIEVA et al., 2000; GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1996; HERNANDEZ; DEL RIO; SEVILLA, 1994; HERNANDEZ et al., 2000; ZHANG; KIRKHAM, 1994).

Para controlar os níveis de EROS e proteger as células contra os danos oxidativos sob condições de estresse, essas contêm mecanismos de ajustamento como enzimas de seqüestro de EROS (Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), peroxidases e glutathiona peroxidase), enzimas de detoxificação da peroxidação lipídica (glutathiona S-transferase, peroxidase glutathiona fosfolípido-hidroperóxido e ascorbato peroxidase-APX) e uma rede de antioxidantes de baixo peso molecular (ascorbato, glutathiona, compostos fenólicos e tocoferóis) (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). Além disso, várias enzimas como monodehidroascorbato redutase, dehidroascorbato redutase e glutathiona redutase são necessárias para regenerar as formas ativas dos antioxidantes (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). Sabe-se que as enzimas oxidativas tais como SOD, CAT, APX dentre outras podem sofrer oxidação em detrimento dos constituintes celulares. Apesar do conhecimento detalhado de uma série de enzimas antioxidantes, a completa rede que envolve todas essas enzimas bem como sua regulação ainda não está totalmente elucidada (BAIER; DIETZ, 1998; FOYER; NOCTOR, 2000; NOCTOR; FOYER, 1998).

1.7.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE - SOD

Dentro das células, as superóxidos dismutases (SOD; EC 1.15.1.1) constituem a primeira linha de defesa contra as EROS. O_2^- é produzido em todo local onde há uma cadeia transportadora de elétrons, assim a ativação do O_2 pode ocorrer em diferentes compartimentos celulares como mitocôndrias, cloroplastos, glioxissomos, peroxissomos, apoplasto e citosol (ELSTNER, 1991). Dessa forma, não é surpreendente que SODs estejam presentes em todas as localizações subcelulares (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; FRIDOVICH, 1986).

O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) tem uma meia vida de menos de um segundo e é geralmente rapidamente dismutado pela enzima SOD à H_2O_2 , um produto que é relativamente estável e pode ser detoxificado pelas enzimas catalase (CAT) e peroxidases (GRANT; LOAKE, 2000). Essa reação tem uma taxa 10 000 vezes maior que a dismutação espontânea (BOWLER et al., 1992). O aumento na atividade da SOD parece conferir tolerância ao estresse oxidativo (BOWLER et al., 1992; SLOOTEN et al., 1995).

As superóxido dismutases são classificadas em três grupos de acordo com o metal cofator utilizado: ferro SOD (FeSOD), manganês SOD (MnSOD) e cobre-zinco SOD (CuZn SOD) e estão localizadas em diferentes compartimentos na célula. Em plantas, a FeSOD está localizada no cloroplasto, a MnSOD, na mitocôndria e peroxissomos e a CuZnSOD no cloroplasto, citosol e possivelmente espaço extracelular (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002).

Estudos filogenéticos através da comparação da seqüência de aminoácidos deduzida a partir das três classes de SODs, demonstram que Mn e FeSOD são as enzimas mais antigas e que muito provavelmente originaram-se de uma enzima ancestral comum. Já a CuZnSODs são distintas das Mn e FeSOD e possivelmente evoluíram separadamente em eucariotos (KANEMATSU; ASADA, 1990; SMITH; DOOLITTLE, 1992). Todas as três enzimas são codificadas no núcleo e seus genes mostraram sensibilidade aos estresses ambientais, presumivelmente como consequência do aumento na formação de EROS (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003).

1.7.2 ASCORBATO PEROXIDASE

A enzima ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11) utiliza o ascorbato (AsA) como seu doador específico de elétrons para reduzir H_2O_2 à água com a concomitante geração de monodehidroascorbato (MDAsA), um oxidante univalente de AsA.

De acordo com a via Halliwell-Asada, o radical monodehidroascorbato pode ser convertido a ascorbato espontaneamente ou pela ação da monodehidroascorbato redutase dependente de NAD(P)H (ASADA; TAKAHASHI, 2002;

HOSSAIN et al. 1984). Contudo, convém salientar que a maior parte do monodehidroascorbato é convertida em ascorbato pela ferredoxina (ASADA, 1997 apud SHIGEOKA et al., 2002). Dehidroascorbato pode ser reduzido a ascorbato não-enzimaticamente ou enzimaticamente pela GSH. Dessa forma, APX em combinação com o ciclo efetivo AsA GSH funciona para prevenir a acumulação de H_2O_2 em níveis tóxicos em organismos fotossintéticos (ASADA, 1992; 1997).

As APXs podem ser identificadas em muitas plantas superiores e compreende uma família de isoenzimas com diferentes características. Elas são distribuídas em pelo menos cinco compartimentos celulares: estroma (eAPX) e tilacóides (tAPX) em cloroplastos; microcorpos (glioxissomos e peroxissomos); ligados à membrana (mAPX); no citosol (cAPX) e na mitocôndria (mAPX) (CHEN; ASADA, 1989; JIMENÉZ et al., 1997; LEONARDIS et al., 2000; MIYAKE et al., 1993; YAMAGUCHI et al., 1995). As APXs encontradas nas organelas, seqüestram H_2O_2 produzidos pelas próprias organelas, enquanto que a função da APX citosólica deve estar relacionada com a eliminação do H_2O_2 que é produzido no citosol ou no apoplasto, e que em seguida difunde-se para as organelas (ASADA 1992, MITTLER; ZILINSKAS, 1992).

Estudos envolvendo purificação, clonagem molecular e funções fisiológicas de isoenzimas da APX indicam que essas são enzimas chaves na prevenção contra o estresse oxidativo em organismos fotossintéticos (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). Mais recentemente, estudos relacionados com a expressão de APX em resposta a condições de estresse abiótico e ao ataque de patógenos indicam a importância da atividade da APX no controle da concentração de H_2O_2 na sinalização intracelular (SHIGEOKA et al., 2002).

1.7.3 PEROXIRREDOXINAS

As peroxirredoxinas (Prx) são caracterizadas como peroxidases com especificidade relativa de substrato, reduzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos de hidrogênio alquil à água e seu álcool correspondente, e peroxinitrito à água e nitrito. Uma das características marcantes das peroxirredoxinas é que são

peroxidases que não contêm grupos heme e dessa forma necessitam de um doador de elétrons externo para compensar a falta do grupo prostético. Como esse doador de elétrons é freqüentemente a tiorredoxina reduzida, as peroxirredoxinas são frequentemente chamadas de peroxidases tiorredoxinas. Essas proteínas parecem ser ubíquas de archaeobactérias a mamíferos e seu tamanho varia de 150 a 220 aminoácidos e sua massa molecular varia de 17 a 22 kDa. Os diversos substratos peróxido reagem com um resíduo específico de cisteína localizado na extremidade N-terminal. Todas as isoformas das Peroxirredoxinas contêm uma cisteína conservada na extremidade N-terminal, sítio catalítico identificado por mutagênese sítio dirigida (CHAE; UHM; RHEE, 1994). Independente do substrato, a cisteína catalítica é transformada em ácido sulfênico após a redução dos hidroperóxidos. Além disso, o mecanismo de regeneração das Prxs reduzida é o mesmo nas diferentes classes dessa enzima.

As peroxirredoxinas possuem uma ou duas cisteínas características em motivos de seqüências altamente conservadas e assim podem ser divididas em 4 subgrupos. O primeiro subgrupo, representado pela peroxirredoxina 1-Cys (1-Cys PRX), foi identificado como proteína relacionada à dormência em plantas. 1-Cis Prx está localizada no núcleo e parece proteger as macromoléculas dos danos oxidativos (STACY et al., 1996; STACY et al., 1999).

O segundo membro identificado em plantas foi o 2-Cis peroxirredoxina (2-Cis Prx), que é uma proteína codificada no núcleo e direcionada para o cloroplasto, onde protege as membranas fotossintéticas dos danos oxidativos (BAIER; DIETZ, 1997; 1999). Verdoucq et al. (1999) isolaram uma proteína tiorredoxina direcionada ao citoplasma com atividade antioxidante. Foi demonstrado que essa Prx seria um novo membro da família peroxirredoxina (Prx tipo II). Finalmente, Prx Q como representante do quarto subgrupo que foi primeiramente identificado em *Sedum*.

Até o momento, as funções das diferentes Prxs de planta não foram ainda completamente elucidadas, mas todas as enzimas parecem ter uma função comum de detoxificação do acil peróxido nos diferentes compartimentos das plantas. As peroxirredoxinas de plantas fazem parte da defesa antioxidante geral, contudo, devido suas diferentes localizações subcelulares elas ainda funcionam no contexto metabólico específico (BAIER & DIETZ, 1999; BAIER et al., 2000). Em *Arabidopsis thaliana*, 4

peroxirredoxinas são direcionadas ao cloroplasto (2-Cis Prx, Prx A, Prx B e Prx Q), uma para a mitocôndria (Prx II F), uma para o núcleo (1-Cis Prx) e quatro permanecem no citosol (Prx II A, Prx II B, Prx II C e Prx II D) (DIETZ et al., 2002; FINKEMEIER et al., 2005; HORLING et al., 2002).

O papel desempenhado pelas peroxirredoxinas presentes no citosol não está ainda bem elucidada, mas o perfil de expressão em diferentes condições sugere que essas isoformas sejam constitutivas e assim ubiqüitárias a despeito das condições ambientais. Particularmente, a Prx Q parece estar envolvida na proteção do fotossistema II face à produção de H_2O_2 (FINKEMEIER et al., 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS:

Estudar o papel da V-ATPase em duas cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, com diferentes graus de tolerância ao estresse salino, através da avaliação dos níveis de proteína e de transcrito e da atividade enzimática bem como o papel de enzimas antioxidantes na proteção contra estresse oxidativo gerado pela salinidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o peso fresco das plantas (raiz, caule e folhas) de duas variedades de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (Vita 3 e Pérola) e utilizá-lo como parâmetro de diferença nos graus de tolerância ao sal;

- Quantificar o teor dos íons Na^+ e K^+ em raízes e folhas de plantas de *V. unguiculata* (L.) Walp (Vita 3 e Pérola) submetidas ao estresse salino;

- Determinar a atividade de hidrólise da V-ATPase em raízes e folhas de plantas de *V. unguiculata* (L.) Walp (Vita 3 e Pérola) submetidas ao estresse salino;

- Determinar a quantidade relativa da subunidade A da V-ATPase em raízes, caules e folhas de plantas de *V. unguiculata* (Vita 3 e Pérola) submetidas ao estresse salino;

- Avaliar o volume vacuolar no ápice radicular de plantas de *V. unguiculata* (cultivar Vita 3) em resposta ao estresse salino;

- Avaliar os níveis de transcritos das subunidades A, B, C, D, E, F, G, H, a, c e d da V-ATPase em folhas de plantas de *V. unguiculata* (cultivares Vita 3 e Pérola) em resposta ao estresse salino;

- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX) em raízes e folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivar Vita 3 submetidas ao estresse salino;

- Avaliar os níveis protéicos das enzimas antioxidantes Peroxirredoxinas II-C e Peroxirredoxinas Q em folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivares (Vita 3 e Pérola) submetidas ao estresse salino.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado foi plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivares Vita 3 e Pérola, cujas sementes foram fornecidas pelo Banco de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

As sementes, previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio 0, 5%, foram semeadas em papel de filtro umedecido com água destilada. Após três dias, as plântulas foram transferidas para recipientes contendo meio nutritivo Hoagland's (HOAGLAND; ARNON, 1938) e cresceram por 2 semanas, em câmara de crescimento (temperatura: 25°C; umidade: 60%; fotoperíodo: 12 horas, etapa realizada na Universidade de Bielefeld-Alemanha) ou em casa de vegetação (temperatura média de 30°C), etapa realizada na Universidade Federal do Ceará. As plantas em condição controle cresceram em meio nutritivo na ausência de NaCl e as plantas em condição de estresse cresceram em meio contendo NaCl (100 mM). Após 2 semanas de desenvolvimento, as plantas foram utilizadas imediatamente ou foram coletadas, congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -75°C para uso posterior.

3.2.2 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

O efeito do NaCl nas plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivares Vita 3 e Pérola, desenvolvidas em câmara de crescimento, foi avaliado através do peso fresco de plantas sob condição de estresse em relação às plantas em condição

controle. As diferentes partes da planta (raiz, caule e folhas) foram cortadas com lâmina, e o peso fresco das raízes, dos caules e das folhas foi aferido em balança analítica.

3.2.3 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS Na^+ E K^+

3.2.3.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

As raízes e as folhas de plantas de *V. unguiculata* (L.) Walp, desenvolvidas em casa de vegetação, ao longo de 14 dias, foram coletadas e colocadas para secar em estufa (40°C) durante duas semanas. As raízes e as folhas secas foram maceradas em graal e o pó resultante foi utilizado na preparação do extrato. O pó de raiz ou de folha (0,1 g) foi adicionado a 10 mL de água deionizada, ficando sob agitação durante 2 horas. Decorrido esse tempo, a mistura foi filtrada e o extrato foi utilizado para dosagem dos íons Na^+ e K^+ .

3.2.3.2 Dosagem de Na^+ e K^+

As concentrações dos íons Na^+ e K^+ foram analisadas de acordo com Malavolta et al. (1989).

3.2.4 PREPARAÇÃO DE ENDOMEMBRANAS

Raízes, caules e folhas de plantas de *V. unguiculata* (L.) Walp, mantidas em condição controle e de estresse salino em câmara de crescimento, foram macerados com auxílio de micropistilo, em Eppendorf (1,5 mL) contendo 1 mL de tampão de homogenização (MgSO_4 3 mM, DTT 1 mM, Polivinilpirrolidona 40 0,5% (p/v) (PVP 40), EGTA 3 mM, Tricina 100 mM, Sacarose 250 mM). O homogenato foi submetido a uma centrifugação de 5.000 g por 5 minutos para remoção das paredes celulares e das células não rompidas. O sobrenadante foi novamente centrifugado a

10.000 g por 30 minutos e o precipitado obtido foi ressuspensão em tampão de homogeneização.

3.2.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas contidas na preparação de endomembranas foram determinadas utilizando-se o reagente Bio Rad (Bio-Rad, Munique, Alemanha) de acordo com o manual de uso. O "Bio Rad Protein Assay" baseia-se no método de Bradford (1976). As leituras foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm e em cada ensaio foi realizada uma curva padrão utilizando BSA como proteína padrão.

3.2.6 ELETROFORESE E IMUNOBLOTTING

As proteínas contidas na fração de endomembranas foram separadas através de eletroforese em gel de poli(acrilamida), de acordo com as medidas abaixo:

Gel de concentração: Acrilamida 6%, Tampão Tris-HCl 370 mM pH 8,8, Temed 5 μ L, Persulfato de amônia 0,066%;

Gel de separação: Acrilamida 12,5%, Tampão Tris-HCl 125 mM pH 6,8, Temed 15 μ L, Persulfato de amônia 0,1 %.

As amostras foram solubilizadas em tampão SDS-PAGE contendo Tris-HCl 125 mM pH 7,0, SDS 2,5%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,02 (p/v) suplementado com DTT 1 mM. Foi aplicada uma amperagem constante de 40 mA. Após a migração das proteínas no gel, essas foram transferidas (transferência semi-seca) para uma membrana de nitrocelulose. Na transferência, foi aplicada Amperagem de 1,5 mA/cm² de membrana e após 40 minutos de transferência, a membrana foi corada com solução Ponceau para comprovar seu sucesso e localizar as bandas referentes às proteínas marcadoras de peso molecular. Após comprovação da transferência de proteínas, a membrana de nitrocelulose foi colocada em solução de bloqueio (TBST 1% Leite desnatado) por 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada

com TBST (Tris 3g, NaCl 8 g, KCl 0,2g, Tween 20 2 mL, volume final 1L) e colocada em contato com a solução do 1°. anticorpo (diluição 1:5000) durante 12 horas a 4°C. Decorrido o tempo, a membrana foi lavada 3 vezes consecutivas com TBST durante 15 minutos. A seguir, a membrana foi incubada com o 2°. Anticorpo acoplado à fosfatase alcalina (diluição 1:10.000) durante 15 minutos à temperatura ambiente (25°C). Posteriormente, a membrana foi lavada com tampão TBST 2 vezes seguidas durante 10 minutos. A visualização das bandas de proteínas foi feita através da utilização do substrato Lumi Light. A membrana foi colocada em contato com esse substrato luminescente por 5 minutos. Após a retirada desse substrato, um filme de raio X foi exposto à membrana e subseqüentemente revelado.

As análises do Western blot foram feitas com anticorpos contra as subunidades A (VHA-A) de *M. crystallinum* da V-ATPase e contra Peroxirredoxina C (Prx II-C) e Q (Prx -Q) de *Arabidopsis thaliana*.

3.2.7 ISOLAMENTO DE TONOPLASTO

O isolamento de vesículas enriquecidas em tonoplasto de raízes e de folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, desenvolvidas em câmara de vegetação em condição controle e de estresse salino, foi realizado de acordo com Dietz, Heber e Mimura (1998). Folhas e raízes foram cortadas e homogeneizadas em graal com meio contendo MgSO₄ 3 mM, DTT 1 mM, Polivinilpirrolidona 40 (PVP 40), EGTA 3 mM, Tricina 100 mM e Sacarose 250 mM. O homogenato foi então filtrado, submetido a uma centrifugação a 5000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 10 000 g por 30 minutos. O precipitado foi ressuspenso em tampão de homogeneização (MgSO₄ 3 mM, DTT 1 mM, Polivinilpirrolidona 40 0,5% (p/v) (PVP 40), EGTA 3 mM, Tricina 100 mM, PMSF 3 mM, Sacarose 250 mM), aplicado sobre o tampão do gradiente de sacarose (Sacarose 25%, DTT 1 mM, PMSF 3 mM, Hepes 5 mM pH 7,5) e submetido a uma centrifugação a 100.000 g por 60 minutos. Após essa centrifugação, a banda contendo as vesículas de tonoplasto situou-se na interface do gradiente de sacarose. As bandas correspondentes às respectivas amostras, foram coletadas e diluídas em meio contendo MgSO₄ 3 mM,

DTT 1 mM, PMSF 3 mM, Hepes 10 mM pH 7,0 e foram novamente centrifugadas a 100.000 g por 20 minutos. O precipitado foi então ressuspenso em meio contendo glicerol 40% (v/v), MgSO₄ 3 mM, DTT 1 mM, PMSF 3 mM, Hepes- KOH 10 mM pH 7,0.

3.2.8 ATIVIDADES DE HIDRÓLISE

A atividade de hidrólise foi determinada colorimetricamente, segundo o método de Fiske e Subbarow (1925). A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mM ao meio (0,5 mL) contendo tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0, MgSO₄ 2 mM, KCl 70 mM, Proteína 30 µg/mL, inibidor da ATPase mitocondrial (Azida 5 mM) e inibidor de fosfatases (NaMoO₄ 0,2 mM). Decorrido 30 minutos de reação a 32°C, a mesma foi parada pela adição de 1 mL do reagente de Fiske. Após 10 minutos, as leituras de absorvância em 750 nm foram feitas em espectrofotômetro. A atividade V-ATPase foi considerada como a atividade ATPásica sensível à bafilomicina, um inibidor específico da V-ATPase. Essa atividade foi medida através da diferença da atividade total pela atividade na presença da bafilomicina (200 ηM).

O reagente de Fiske é formado pela união da solução A e B na proporção 100:1.

SOLUÇÃO A:

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

SOLUÇÃO B:

Ácido ascórbico 10% (p/v)

3.2.9 ANATOMIA DE ÁPICE DE RAIZ E ESTIMATIVA DO VOLUME VACUOLAR

Ápices de raízes de plantas de *V. unguiculata* (L.) Walp, sob condição controle e de estresse, mantidas em casa de vegetação, foram coletadas e mantidas no meio nutritivo no qual estavam desenvolvendo-se. A seguir, o material coletado foi embebido por 24 horas em solução de fixação (solução de glutaraldeído 2%, formaldeído 37% no volume de 2 mL do meio nutritivo). Depois de 24 horas, os ápices das raízes foram lavados três vezes em intervalos de 5, 5 e 10 minutos respectivamente, com a solução nutritiva das plantas. A seguir foi realizada a desidratação seriada em álcool 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% por 30 minutos em cada concentração. Posteriormente, as raízes desidratadas foram pré-infiltradas utilizando solução de álcool e resina, e mantidas em dessecador acoplado a uma bomba de vácuo por 30 minutos e ao longo de 15 horas na ausência da referida bomba. Em seguida, as raízes foram novamente colocadas em solução de infiltração e em dessecador acoplado à bomba de vácuo. Os blocos de resina foram feitos utilizando 2 mL de solução de infiltração e 133 μ L de endurecedor (historesina). As raízes foram cuidadosamente colocadas no bloco numa orientação longitudinal. Após a secagem do bloco, foram realizados cortes longitudinais de 5 μ m, as lâminas preparadas foram coradas com azul de toluidina 0,012% e fucsina 0,05% e montadas com entelan.

3.2.10 MACROARRANJO

Os macroarranjos de DNA são suportes sólidos de náilon, aos quais estão fixadas, de forma ordenada, seqüências completas ou parciais de genes. O DNA dos genes é depositado em membranas réplicas, contendo os mesmos genes nas mesmas posições, em densidades que variam de 10 a 1000 genes/cm² (FÉLIX et al., 2002). As sondas de cDNA marcadas (por exemplo com digoxigenina) produzidas a partir do RNA das células em estudo são hibridizadas com os arranjos e quanto maior a expressão de um gene em uma determinada condição, maior será o número de cDNAs desse gene na sonda sintetizada. Conseqüentemente, maior será o valor de

intensidade do sinal derivado da sonda hibridizada na região do arranjo que contém a seqüência desse gene.

O ensaio de macroarranjo constituiu-se na hibridização de quatro membranas de náilon, contendo genes de 11 subunidades da V-ATPase de *Mesembrythemum crystallinum* com quatro preparações independentes de cDNA de folhas obtidos de duas variedades de *V. unguiculata*, Vita 3 e Pérola, nas condições controle e de estresse salino. A figura 4 mostra um desenho esquemático do ensaio de macroarranjo.

3.2.10.1 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS DO MACROARRANJO

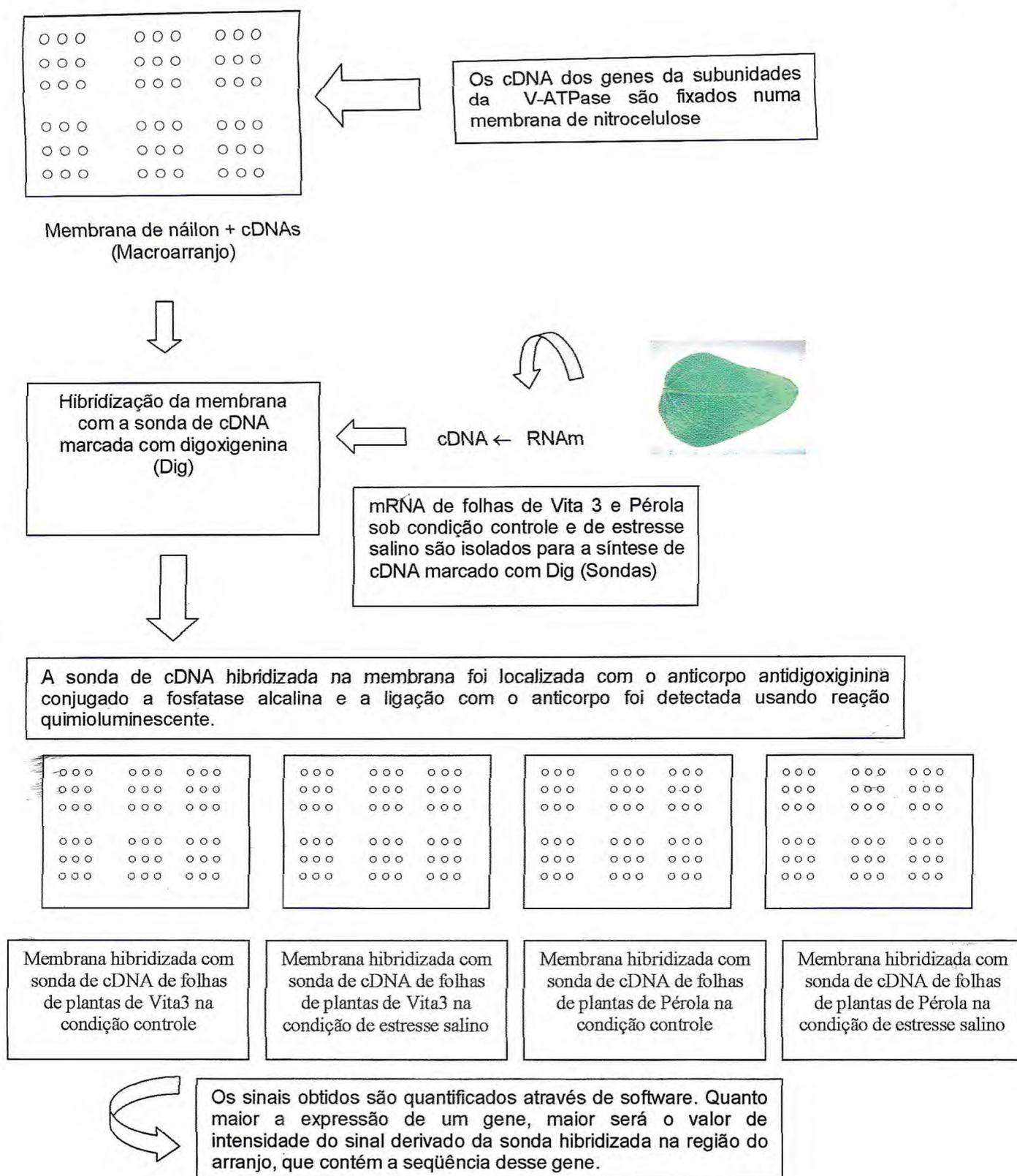
A preparação do macroarranjo foi realizada por Kluge e colaboradores (2003). O quadro 3 mostra os primers usados para a amplificação de fragmentos de cDNA de aproximadamente 500pb cada. Os cDNAs de 11 subunidades da V-ATPase de *M. crystallinum* (VHA-A, B, C, D, E, F, G, H, a, c e d), foram fixados em membrana de nylon Hybond N usando robôs do Centro Genoma da Universidade de Bielefeld e fixados com iluminação UV (240 nm, 0,125 J/cm² Stratlinker, Stratagene) como descrito por Kluge et al. (2003).

3.2.10.2 SÍNTESE DAS SONDAS DE CDNA

ISOLAMENTO DE RNA

O isolamento de RNA foi realizado de acordo com o método de Chomczynski e Sacchi (1987), através do uso do reagente Trizol. O Trizol (Gibco-BRL, Karlsruhe Germany) consiste de uma solução monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina e clorofórmio, sendo considerado um sistema adequado para a extração de RNA total de células e tecidos.

Folhas de ambas as cultivares de *V. unguiculata*, sob condição controle e de estresse salino, previamente congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -75°C foram maceradas em graal pré-resfriado com Nitrogenio líquido. 200mg do tecido macerado (pó) de cada amostra foi coletado com espátula pré-resfriada e colocado em



Quadro 3. Desenho esquemático da hibridização do macroarranjo com sondas de cDNA de folhas de plantas de *V. unguiculata* em condição controle e submetidas ao estresse salino.

Tabela 1. Primers de oligonucleotídios para clonagem de cDNAs VHA e fragmentos de cDNA para o macroarranjo (Kluge et al., 2003).

Gene	Primer	Seqüência (5' → 3')
Primers usados para PCR-RACE		
McVHA-A	McVATP-A-f	CAGGTG GCA AAA TCA CTT A
McVHA-A	McVATP-A-r	CAC TAT CTG CAG GCA TTT CC
McVHA-B	McVATP-B-f	GTA CAC CAG TGC CCA GTT GCA TCA G
McVHA-B	McVATP-A-r	ATC CCT TGC GTG CTT GTA AGC
McVHA-G	McVATP-G-f	TGA GAA TGC AAG CAA GCA GAG C
McVHA-G	McVATP-G-r	CCA CAT TAG CAA CCT GGA GTC T
McVHA-H	McVATP-H-f	GGT TGT TCA GAA CTT GAA AGC
McVHA-H	McVATP-H-r	GCA AAC AGC AAG TGA CCT TGG
McVHA-a	McVATP-a-f	TTT GCT ACT GTT GTT GTG TTG
McVHA-a	McVATP-a-r	GAT ACA TGG CCT TGC TAC TG
McVHA-d	McVATP-d-f	CAG CTC CCT CAT ATT CTG AG
McVHA-d	McVATP-d-r	ATG GGA TTT TTA ATC ACA ACC
RACE-específico	AP1	CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCG
RACE-específico	AP2nested	ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC
Primers adicionais usados para o arranjo da V-ATPase		
McVHA-C	VHA-C-f	GGC TTT GACTGT TGA ATG GAG
McVHA-C	VHA-C-r	GGT GGC AAC TAT CTC AA
McVHA-D	VHA-D-f	TCC TAT CTC TCT TTC TCT CTT TGG C
McVHA-D	VHA-D-r	TTG TCA CCC AGC AAC ATA CTT TAC C
McVHA-E	MAE-1	GAG AAG GCC AAC GAG ATC
McVHA-E	MAE-2	GCA ACG CAA GAC AGC
McVHA-F	VHA-F-f	GGA GTT CAC AGC AAG AGA GGA C
McVHA-F	VHA-F-r	TGG CTG ATT AGT ACA ACC GC
McVHA-c	McVATP-c-f	ATG TCA ACC GTC TTC AAT GCG
McVHA-c	McVATP-c-r	CTG CCC TTG ACT GTC CAG CTC G
Actina	Ac5'	GGX ACT GGA ATG GTX AAG G
Actina	Ac3	GTG ATC TCC TTG CTC ATA CG

um tubo de microcentrífuga (Eppendorf 1,5 mL) contendo 1 mL de Trizol (Gibco-BRL, Karlsruhe Germany). Após agitação em Vortex, as amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente e então centrifugadas a 4°C a 10000 g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e incubado novamente por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 200 µL de clorofórmio e os tubos foram vigorosamente agitados manualmente por 15 segundos, incubados à temperatura ambiente por 3 minutos e submetidos a uma centrifugação a 10000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a ele foi adicionado 500 µL de isopropanol. As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 10000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante resultante dessa centrifugação foi removido e o precipitado contendo RNA foi lavado com solução de etanol 75% (em água tratada com DEPC). As amostras foram agitadas em Vortex e centrifugadas a 7500 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo o RNA foi colocado para secar por aproximadamente 5 minutos. A seguir, o RNA foi ressuspensão em quantidade apropriada de DEPC-H₂O previamente aquecida a 65°C.

CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE RNA

A concentração de RNA contido nas amostras foi determinada através de medidas espectrofotométricas. A absorbância das amostras de RNA diluídas em DEPC-H₂O (2 µL de RNA em 198 µL de H₂O) foram medidas nos seguintes comprimentos de onda: 260 e 280, que correspondem a picos de absorção de ácidos nucleicos e proteínas. A relação da absorbância de RNA (A_{260}/A_{280}) de 1,7 a 2,1 é indicativa de RNA altamente purificado. Dessa forma, foram utilizados somente amostras de RNA com relação 260/280 nm igual ou maior que 1,7 e o cálculo da concentração foi feito de acordo com a seguinte fórmula:

RNA Total (µg/µL) = leitura da absorbância (260 nm) x 40 µg/mL x fator de diluição.

A leitura de A_{260} de 1,0 equivale a 40 µg/mL de RNA de fita simples.

SÍNTESE DA SONDA DE cDNA

A síntese da sonda de cDNA foi realizada em tubo de microcentrífuga, contendo 2 μL de Oligo dT (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 20 μg de RNA e água destilada estéril em volume final de 13 μL . Essa mistura foi homogeneizada rapidamente em vortex, centrifugada por 5 segundos, aquecida à 70°C por 10 minutos, colocada em gelo por 2 minutos e em seguida, centrifugada por 5 segundos. Adicionou-se a esse tubo 6 μL de tampão „First Strand“, 3 μL DTT 0,1 M e 5 μL de DIG-dNTP (dNTP marcado com digoxigenina) e após homogeneização cuidadosa foi submetida a nova centrifugação por 5 segundos. Após incubação à 42°C por 2 minutos, adicionou-se 1 μL de Transcriptase Reversa II. Essa homogeneização foi feita cuidadosamente através do uso de pipeta automática, a seguir foi incubada à 42°C por 60 minutos. Após esse tempo, a reação foi inativada por incubação à 70°C por 15 minutos, a seguir as amostras foram colocadas em gelo por 2 minutos, centrifugada por 5 segundos e armazenadas a -20°C.

A purificação do cDNA sintetizado foi realizada através da utilização do kit QiAquick PCR purification (Qiagen). O cDNA foi diluído no tampão PB (Quiagen) (5 x X μL cDNA). A mistura resultante, foi agitada e introduzida numa mini coluna do kit „QIAquick spin column“ acoplada a um tubo coletor. Após centrifugação por 1 min a 6000 g, o eluído coletado foi descartado e o cDNA foi lavado com 750 μL do tampão PE que foi removido completamente através de duas centrifugações idênticas à anterior. Para eluir o cDNA, 50 μL de água esterilizada (preaquecida a 70°C) foi adicionada na minicoluna a qual foi centrifugada a temperatura ambiente a 13000 g durante 1 min. O eluído contendo o cDNA foi coletado e armazenado a -20°C.

AValiação DA SONDA DE cDNA MARCADA COM DIG

A avaliação da síntese de cDNA marcado com digoxigenina (DIG), foi feita através da adição de 1 μL de DNA controle na diluição 1/10 e 1/100 e 1 μL dos cDNAs das amostras a serem testadas, a uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi mantida a temperatura ambiente para secar e o cDNA então foi fixado na membrana com 0,14 J/cm² luz UV. Após uma breve lavagem com tampão de ácido

maléico (ácido maléico 100 mM , NaCl 150 mM pH 7,5), a membrana foi incubada por 30 minutos em tampão de bloqueio (1 mL de solução de bloqueio (1 g de reagente de bloqueio/9 mL de tampão de ácido maléico) diluída em 9 mL de tampão de ácido maléico 150 mM pH 7,5) em plataforma de agitação e em seguida, incubada por 30 minutos em solução anti-DIG (1 µl anti-DIG fosfatase alcalina/5ml solução de bloqueio). As membranas ficaram sob agitação e após esse tempo, foram lavadas duas vezes a cada 15 minutos no mesmo tampão (ácido maléico). As mesmas foram imersas em tampão de detecção (Tris HCl 1 M pH 9,5, NaCl 5 M, e MgCl₂ 1 M) e após três minutos foram colocadas em contato com o substrato (100 µl NBT (75 mg/ mL) / BCIP (50 mg/mL) em 5 ml de tampão de detecção) e incubadas no escuro para a revelação através da formação de precipitado púrpura insolúvel. A reação foi parada pelo contato da membrana com água. Os cDNAs marcados com DIG foram estimados visualmente através de comparação da intensidade dos sinais das amostras com os sinais do DNA controle como mostrado na figura 5. Somente os cDNAs comprovadamente marcados com DIG foram utilizados nas etapas posteriores.

3.2.10.3 PRÉ HIBRIDIZAÇÃO E HIBRIDIZAÇÃO DA SONDA

Os macroarranjos de cDNA foram primeiramente incubados com solução Dig Easy Hyb (Roche) em forno de hibridização por 2 horas a 42°C. Essa pré-hibridização bloqueia uma possível ligação não específica de RNAs.

As amostras de cDNA marcadas com digoxigenina (sondas), sintetizadas a partir de mRNA de folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp em condição controle e de estresse salino, foram desnaturadas a 100°C por 10 minutos. As sondas foram colocadas em tubos Falcon (50 mL) contendo 10 mL de solução Dig Easy Hyb (Roche) e incubadas cada uma com uma membrana em forno de hibridização por 16 horas a 42°C. Subseqüentemente, a solução (Dig Easy Hyb + sondas) foi retirada e as membranas foram lavadas duas vezes com SSC 2x (NaCl 0,3 M, citrato de sódio 3 mM pH 7,0/SDS 0,1%(p/v) à temperatura ambiente e duas vezes em SSC 0,5 x (NaCl 75 mM, citrato de sódio 0,75 mM pH 7,0/SDS 0,1% (p/v), à 42°C, por 15 minutos cada, para a retirada de sonda remanescente. A seguir, as membranas foram incubadas por



Figura 5. Estimativa de síntese de cDNA marcado com DIG através de análise comparativa com DNA controle (DNA marcado com DIG). (C) cDNA controle; (1) cDNA da amostra 1; (2) cDNA da amostra 2.

30 minutos em 10 mL de solução de bloqueio (Roche), lavadas duas vezes com tampão de lavagem e equilibradas em tampão de detecção. Subseqüentemente, os arranjos foram incubados com um anticorpo monoclonal antidigoxigenina acoplado com fosfatase alcalina (Roche) e a reação de detecção com o substrato quimioluminescente CSPD foi acompanhada como recomendado por Roche. Filmes de raio-X foram expostos às membranas por 1, 3, 5 e 14 horas, foram revelados e os sinais digitalizados com um scanner de transmissão (JX 3030, Sharp, Japan). A intensidade dos sinais foi analisada com o Software Aida Image (Raytest, Straubenhardt, Alemanha). Os dados foram processados seguindo a subtração do *background* local.

Os níveis de transcritos de cada subunidade na condição controle foram considerados 100% e os níveis em condição de estresse expressaram a porcentagem em relação ao controle. Os genes cujos níveis de transcritos, sob condição de estresse, mostraram níveis acima de 100% foram considerados induzidos e os genes cujos níveis estavam abaixo de 100% foram considerados reprimidos.

3.2.10.4 ALINHAMENTO DE SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DA SUBUNIDADE A DA V-ATPASE EM *MESEMBRIANTHEMUM CRYSTALLINUM* E *VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP

As seqüências nucleotídicas da subunidade A da V-ATPase de *Mesembrianthemum crystallinum* e de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, foram obtidas em banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. As duas seqüências foram subseqüentemente alinhadas para a identificação das regiões conservadas. O alinhamento foi feito utilizando o programa clustalw, disponível em: <http://www.ebi.ac.uk./clustalw/>.

3.2.11 RT-PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste na amplificação seletiva de uma determinada região de uma molécula de DNA. Qualquer região da molécula de DNA pode ser selecionada, desde que as seqüências nas extremidades

sejam conhecidas, pois a enzima DNA polimerase necessita de iniciadores para as reações de síntese. Os iniciadores são oligonucleotídeos que possuem a capacidade de se hibridizar com a molécula de DNA, em cada uma das fitas da hélice. Já na RT-PCR, o molde para a reação de polimerização em cadeia é a molécula de RNA. O primeiro passo em uma RT-PCR é converter a molécula de mRNA em um cDNA de fita simples através da ação da transcriptase reversa (BROWN, 2003).

A técnica da PCR envolve várias etapas:

1. Desnaturação: o aquecimento à temperatura próxima da ebulição (94°C) desnatura o DNA-alvo e cria um conjunto de moldes de fita simples. O aquecimento aumenta a energia cinética da molécula de DNA a um ponto mais alto que a energia necessária para a manutenção das pontes de hidrogênio entre os pares de bases. O DNA dupla fita é separado em fitas simples.

2. Anelamento (pareamento): o resfriamento de aproximadamente 65°C favorece o anelamento dos primers oligonucleotídeos a suas seqüências complementares sobre as fitas simples (molde). A temperatura ótima de anelamento varia de acordo com a proporção de pares de bases AT e CG na seqüência dos primers.

3. Extensão: o aquecimento a 72°C fornece uma temperatura ótima para a atuação da DNA polimerase que procederá à extensão do primer de oligonucleotídeos. A polimerase sintetiza uma segunda fita complementar à fita molde original.

Ao longo de cada ciclo de síntese, que dura cerca de 2 minutos, o número de cópias da molécula de DNA-alvo é duplicado. Vinte e cinco ciclos de síntese produzem, teoricamente, uma amplificação de 1.000.000 de vezes da seqüência-alvo em um período de aproximadamente 1 hora (MICKLOS; FREYER, 2005).

3.2.11.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

O isolamento de RNA foi realizado através do uso de um "kit" de extração - RNeasy plant mini kit (Qiagen).

O tecido vegetal (200 mg de folhas), previamente congelado em N₂ líquido e armazenado a -75°C foi macerado em graal pré-resfriado, contendo nitrogênio líquido. Os lisados celulares pulverizados produzidos pelo processo da disrupção foram transferidos para tubos eppendorf. Aos tubos foi acrescentado tampão RLC (450 µL), um tampão altamente desnaturante contendo o isotiocianato de guanidina, que imediatamente inativa RNAses, assegurando o isolamento de RNAs intactos, e a seguir foi realizada uma vigorosa agitação em "vortex" para produzir uma completa homogeneização. A amostra homogeneizada foi aplicada em uma mini coluna do "kit" ("QIAshredder spin column" acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e centrifugada a 8000 g por 2 minutos. O eluído foi recuperado e transferido para um novo tubo Eppendorf e misturado a 450 µL de etanol (95%), para fornecer condições adequadas de ligação do RNA. Posteriormente, 700 µL dessa mistura foram transferidos para uma nova coluna do "kit" ("RNeasy mini spin column", acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e efetuada uma centrifugação a 8 000g por 15 segundos. O eluído foi descartado e foram adicionados à coluna 700 µL de tampão RW1 e submetido novamente a centrifugação de 8 000g por 15 segundos, para lavagem. A coluna foi então transferida para um novo tubo coletor, foram adicionados 500 µL de RPE e submetida à centrifugação de 8 000 g por 15 segundos. O eluído foi posteriormente descartado e o tubo coletor foi reutilizado na mesma coluna. 500 µL de RPE foi adicionado à coluna e esta centrifugada a 8 000g por 2 minutos para remoção de qualquer resíduo de etanol que poderia interferir com as reações subseqüentes. O eluído e o tubo coletor foram descartados e a coluna reutilizada com um novo tubo coletor de 1,5 mL. Finalmente, foram adicionados 40 µL de água livre de RNase diretamente à coluna e esta centrifugada a 8 000g por 1 minuto para completa eluição. O eluído era o RNA total que foi posteriormente armazenado à -20°C para subseqüentes análises eletroforéticas e de RT-PCR.

A concentração e a integridade do RNA foram avaliadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose. A quantificação do RNA total foi calculada da mesma forma como descrito no item 3.2.10.2 (Isolamento de RNA).

3.2.11.2 RT-PCR

A síntese de cDNAs e posterior reação de PCR, foi realizada a partir de 1 µg de RNA total de hipocótilos de *Vigna unguiculata* com auxílio de um "kit" "Ready-To-Go™ RT-PCR Beads" (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). Cada tubo eppendorf do "kit" continha esferas liofilizadas que possuem Taq DNA polimerase (2.0 U), TRIS-HCl 10 mM (pH 9.0), KCl 60 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP, transcriptase reversa de Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) (FPLCpure™), inibidor de ribonuclease (porcine) (RNAGuard™) e estabilizadores tais como BSA livre de RNase e DNase. Para construção da primeira fita de cDNA foram utilizados os primers pd(N)₆ e o pd(T)₁₂₋₁₈. Após a síntese de cDNA, seguiu-se o ensaio da reação de RT-PCR.

O ensaio da RT-PCR foi realizado como está mostrado abaixo:

REAGENTES	
H ₂ O DEPC qsp	50 µL
pd(N) ₆ 0,5 µg/µl	1 µL
pd(T) ₁₂₋₁₈ 0,5 µg/µl	1 µL
Primer VHA-A F 10 pmoles	1 µL
Primer VHA-A R 10 pmoles	1 µL
MgCl ₂ 5 Mm	0,5 µL
RNA TOTAL	1 µg

O programa utilizado para amplificar o gene da subunidade A (VHA-A) da ATPase através da RT-PCR foi o seguinte:

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1° ao 25° Ciclo		
Desnaturação	92	1
Anelamento	62	2
Alongamento	72	2
	72	10
Extensão		
Armazenamento	4	α

Após o encerramento dos ciclos de amplificação, a mistura de reação foi armazenada a -20°C até ser utilizada.

Os oligonucleotídeos utilizados foram obtidos de regiões conservadas complementares às extremidades 5' e 3' do cDNA da subunidade A da ATPase de *Vigna radiata*. As regiões conservadas foram determinadas comparando as seqüências dos genes para essas enzimas nas cultivares de arroz, de cenoura e de *Vigna radiata*. As seqüências deduzidas de cada oligonucleotídeo estão descritas abaixo:

VHA-A ATPase senso: 5' GCCTCCTGATGCCATGGGA 3'

VHA-A ATPase anti-senso: 5' CGCATCATCCAAACAGACT 3'

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (PCR Thermal-Cycler TC-480, Perkin Elmer Cetus), utilizando-se ciclos de temperatura de 92, 62 e 72°C. As amostras de DNA foram aquecidas à 100°C por 5 minutos e depois resfriadas por 2 a 3 minutos em banho de gelo antes de serem adicionadas ao meio de reação.

3.2.11.3 ELETROFORESE DO cDNA AMPLIFICADO

A avaliação da amplificação do cDNA da subunidade A ATPase de *Vigna unguiculata* (L.) Walp foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando-se TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 2 mM) como tampão de corrida. Após a aplicação da amostra no gel (20 µL) para visualização das bandas, foi aplicada uma amperagem de 40 mA, utilizando-se uma fonte regulável de corrente contínua durante 90 minutos à temperatura de 25°C. O gel foi tratado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 15 minutos e as bandas foram detectadas pela emissão de fluorescência obtida pela exposição do gel a raios ultravioleta.

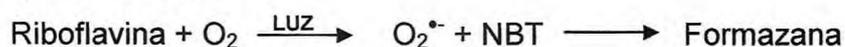
3.2.12 ATIVIDADES DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

3.2.12.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS E RAÍZES

Raízes e folhas de plantas de *V. unguiculata* (L.) Walp, mantidas em condição controle e de estresse salino, em casa de vegetação, foram congelados em Nitrogênio líquido e em seguida, liofilizadas. Após a liofilização, o material vegetal foi macerado até se transformar em pó e armazenado a 4°C. 0,1 g do material vegetal (raízes e folhas) foi homogeneizado em 10 mL de tampão de extração (Tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8, MgCl₂ 5 mM, EDTA 5 mM, DTT 5 mM e Glicerol 10%) e centrifugado a 10.000 g por 15 min. O sobrenadante foi utilizado como extrato.

3.2.12.2 ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade total da enzima foi medida através de método indireto, de acordo com a seguinte reação:



O ensaio da atividade da SOD foi realizado em tubos contendo 1mL de tampão fosfato de potássio 36 mM pH 7,8, EDTA 0,1 mM e Metionina 19,5 mM. Aos tubos, foram acrescentados 50 µL do extrato enzimático diluído (1:5), 150 µL de NBT (750 µM) e 300 µL de riboflavina (10 µM). A seguir, os mesmos foram transferidos para câmara escura acoplada com lâmpada fluorescente de 20 W. A lâmpada foi ligada concomitante com o disparo do cronômetro e após 15 minutos, a atividade SOD foi medida através de leituras espectrofotométricas a 560 nm. Os tubos controle continham o tampão de reação, o tampão de extração, NBT e riboflavina. A atividade foi expressa em unidades de atividade x g⁻¹ de matéria seca. Considera-se 1 unidade de atividade enzimática (UA), a quantidade de enzima requerida para causar uma inibição de 50% na taxa de fotorredução do NBT.

3.2.13.3 ATIVIDADE DA ENZIMA ASCORBATO PEROXIDASE

O meio para dosagem da atividade da APX continha 1,1 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM EDTA 50 mM pH 6,0, 50 μ L de H₂O₂ 30 mM, 50 μ L de ascorbato 0,5 mM e 300 μ L de extrato enzimático. A atividade foi medida espectrofotometricamente a 290 nm em intervalos de 15 em 15 segundos durante 5 minutos. A atividade enzimática da APX foi expressa em μ M H₂O₂. min⁻¹.g⁻¹de matéria seca.

4 RESULTADOS

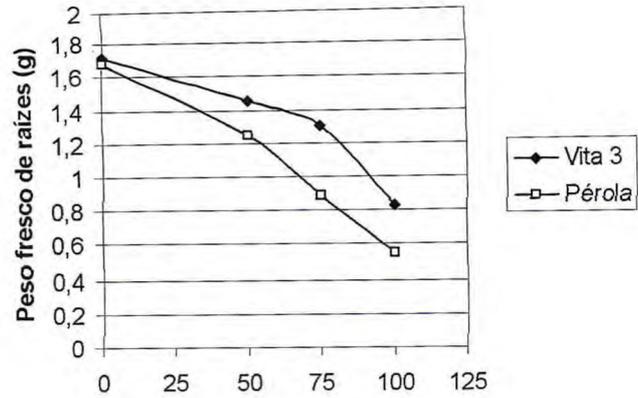
4.1 PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS

O desenvolvimento das plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, Vita 3 e Pérola submetidas à diferentes concentrações de NaCl (25, 50, 75, 100, 150 e 200 mM), foi acompanhado em câmara de crescimento durante 14 dias, através de medidas do peso fresco nas diferentes partes das plantas. Essas foram diferentemente afetadas por NaCl e concentrações de NaCl de 150 e 200 mM inibiram totalmente o crescimento das duas cultivares (dados não mostrados).

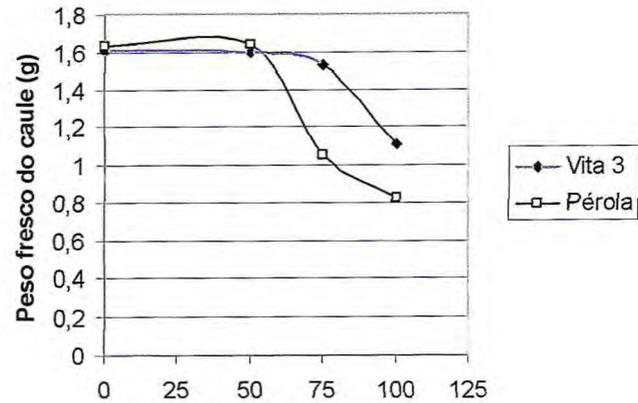
A figura 6 mostra o efeito de diferentes concentrações de NaCl (50, 75 e 100 mM) no peso fresco das raízes, dos caules e das folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivares Vita 3 e Pérola. O peso fresco de todas as partes das plantas submetidas ao estresse salino foi diferentemente reduzido e essa redução foi dependente da concentração de NaCl. Em plantas de *V. unguiculata* (L.) Walp submetidas a 50 mM de NaCl, a diminuição do peso fresco foi de 17 e 26% em raízes e de 13 e 12% em folhas, nas cultivares Vita 3 e Pérola, respectivamente. Em plantas submetidas a 75 mM de NaCl, a inibição no peso fresco foi de 24 e 47% em raízes, 5 e 36% em caules e 27 e 47% em folhas nas cultivares Vita 3 e Pérola, respectivamente. A maior inibição no peso fresco de plantas ocorreu a 100 mM de NaCl, sendo a folha o órgão mais afetado pela salinidade, revelando inibição de 51% na cultivar Vita 3 e 72% na cultivar Pérola. As raízes também mostraram grande sensibilidade a 100 mM de NaCl, com inibição de 52% no peso fresco em Vita 3 e 67% em Pérola. Os caules foram o órgão menos afetado, a inibição foi de 31,7 e 49% nas cultivares Vita 3 e Pérola, respectivamente.

A cultivar Pérola mostrou-se mais sensível ao estresse salino do que a cultivar Vita 3 em quase todos os tratamentos com sal e em todos os órgãos da planta estudados. A concentração de 100 mM de NaCl foi a escolhida para caracterizar a condição de estresse salino na qual as plantas serão submetidas e que será utilizada nos experimentos subseqüentes.

(A)



(B)



(C)

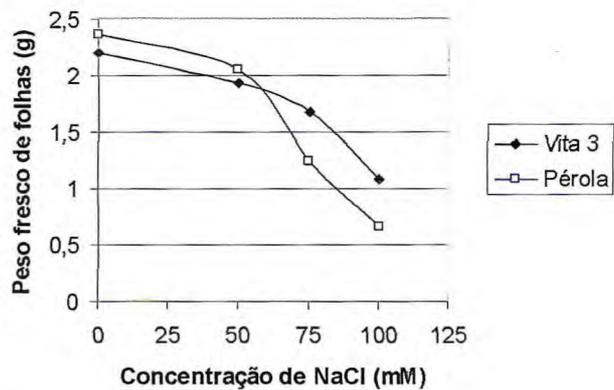


Figura 6. Efeito de diferentes concentrações de NaCl no peso fresco de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivares Vita 3 e Pérola. (A) peso fresco de raízes; (B) peso fresco de caules e (C) peso fresco de folhas. As sementes foram semeadas em papel de filtro umedecidos com água destilada, após três dias as plântulas foram transferidas para recipientes contendo meio nutritivo de Hoagland's com diferentes concentrações de NaCl (50, 75 e 100 mM) e desenvolveram-se por 2 semanas. Os dados representam médias de três experimentos e em cada experimento foram utilizadas 30 plantas.

4.2 TEOR DE ÍONS Na^+ E K^+

A quantidade de íons Na^+ e K^+ , foi analisada em raízes e folhas das duas cultivares de *V. unguiculata* (Vita 3 e Pérola), no 17°. dia após a semedura, em casa de vegetação em condição controle (ausência de NaCl) e de estresse salino (100 mM NaCl) (Figuras 7 e 8). O teor de Na^+ nas raízes da cultivar Pérola em plantas controle, correspondeu a 25% do teor da cultivar Vita 3. O teor de Na^+ nas raízes de ambas as cultivares aumentou em decorrência da exposição das plantas à salinidade, constatando-se aumentos de 3,5 vezes na cultivar Vita 3 e de 10,4 vezes na cultivar Pérola (Figura 7A). Já o teor de Na^+ nas folhas de plantas controle das cultivares Vita 3 e Pérola foi semelhante. Plantas submetidas ao estresse salino apresentaram aumento no teor de Na^+ de 13,5 vezes na cultivar Vita 3 e 14,3 na cultivar Pérola (Figura 7B).

Em relação à quantidade de íons K^+ , tanto nas raízes quanto nas folhas, nenhum aumento em função da exposição das plantas à salinidade foi observado. Entretanto, o teor de K^+ na cultivar Pérola foi significativamente maior do que a cultivar Vita 3, tanto na condição controle como na condição de estresse salino (Figura 8).

A relação Na^+/K^+ foi calculada a partir dos valores das concentrações dos íons Na^+ e K^+ nas raízes e nas folhas de plantas de *V. unguiculata* (L.) Walp cultivares Vita 3 e Pérola, em condição controle e de estresse salino e os resultados estão mostrados na tabela IV. A relação Na^+/K^+ de ambas as cultivares aumentou em resposta ao estresse salino, tanto em raízes como em folhas. Em raízes, foram observados aumentos de 380% na cultivar Vita 3 e 1300% na cultivar Pérola. Já em folhas, esse aumento foi de 1400% na cultivar Pérola e de 1360% na cultivar Vita 3. Os dados representam média de três experimentos independentes.

4.3 ANÁLISE DOS NÍVEIS PROTÉICOS DA SUBUNIDADE A DA V-ATPASE

A quantidade relativa da subunidade A da V-ATPase foi analisada em raízes, caules e folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, sob condição controle

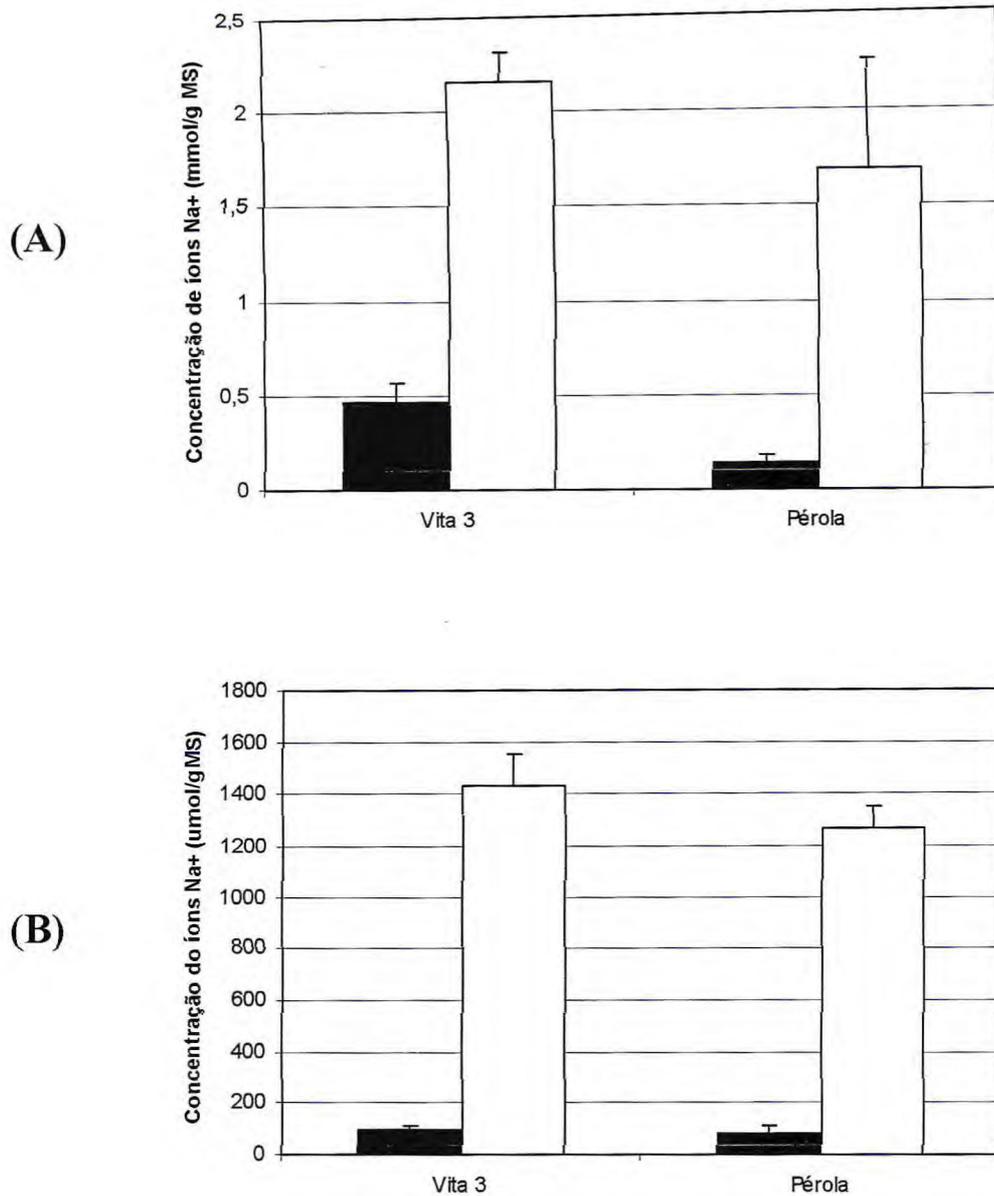


Figura 7. Concentração de íons Na^+ em raízes (A) e folhas (B) de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivar Vita 3 e Pérola sob condição controle (■) e de estresse salino (□). As sementes foram semeadas em papel de filtro umedecidos com água destilada, após três dias as plântulas foram transferidas para recipientes contendo meio nutritivo de Hoagland's na ausência e presença de NaCl 100 mM e as plantas desenvolveram-se por 2 semanas. Os dados representam média de três experimentos independentes.

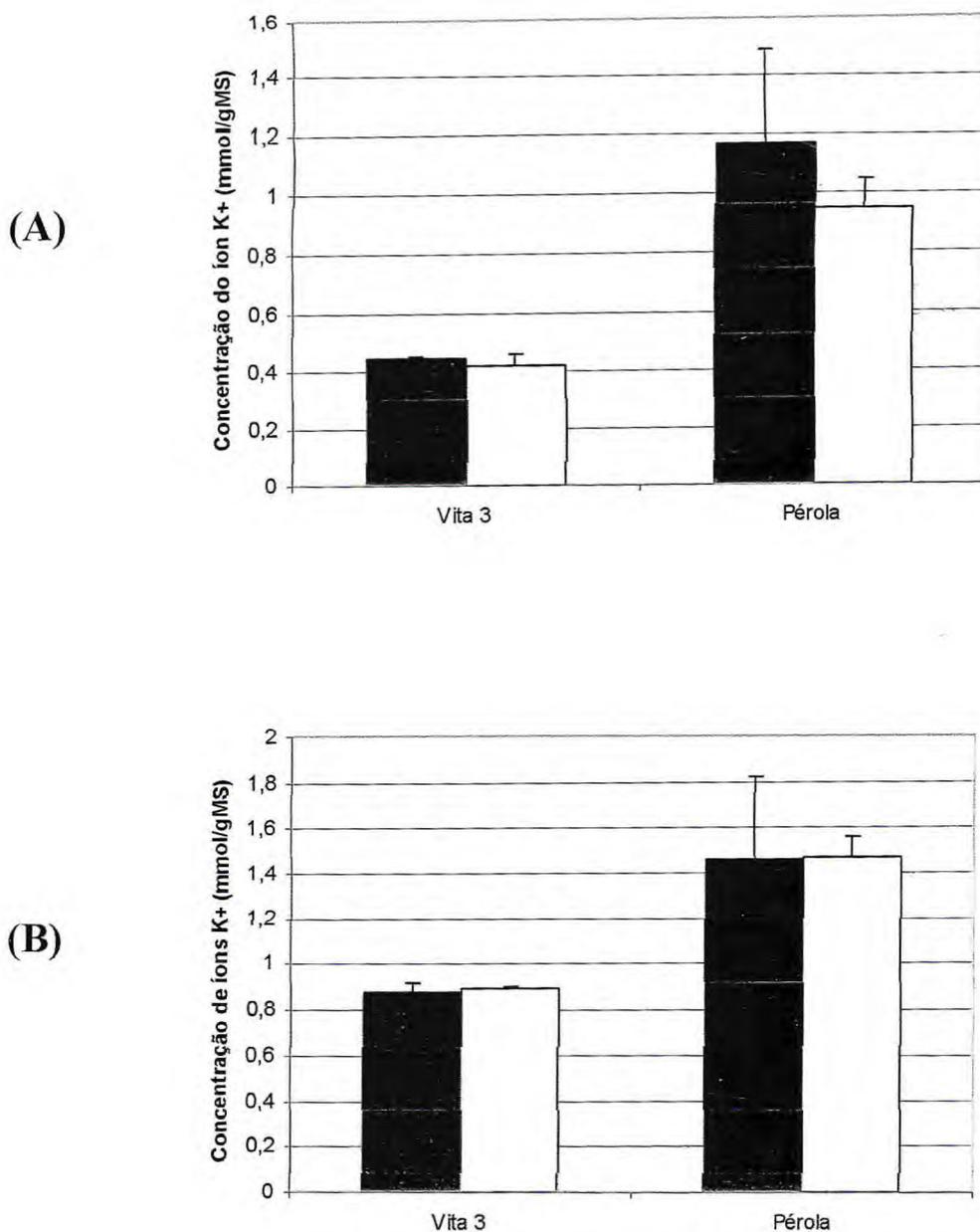


Figura 8. Concentração de íons K⁺ em raízes (A) e folhas (B) de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivar Vita 3 e Pérola sob condição controle (■) e de estresse salino (□). As condições ambientais foram descritas na figura 7. Os dados representam média de três experimentos independentes.

Tabela 1. Relação Na^+/K^+ em raízes e folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivar Vita 3 e Pérola, sob condição controle e de estresse salino (plantas expostas a 100 mM NaCl durante 2 semanas).

	Raiz controle	Raiz estresse salino	Folha controle	Folha estresse salino
Vita 3	1,06	5,10	0,11	1,61
Pérola	0,126	1,78	0,057	0,863

e de estresse salino (100 mM de As condições NaCl), através de análise de Western blot, utilizando frações de endomembranas (10 µg de proteína) e anticorpo contra a subunidade A de *Mesembryathenum crystallinum* (VHA-A) (Figura 9).

Os níveis relativos da subunidade A da V-ATPase em raízes, de ambas as cultivares, aumentaram 207 e 51% em resposta ao estresse salino em Vita 3 e Pérola, respectivamente. Em caules, não foram detectadas mudanças significativas nos níveis da subunidade A em decorrência da salinidade. Em folhas, os níveis da subunidade A da V-ATPase aumentaram 280% em Vita 3 e não sofreram alterações significativas em Pérola. Dessa forma, a quantidade relativa da subunidade A da V-ATPase aumentou em resposta ao estresse salino nas raízes de ambas as cultivares e nas folhas da cv. Vita 3 e os maiores aumentos foram observados na cultivar Vita 3 (Figura 9B).

4.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE HIDRÓLISE DA V-ATPASE

Vesículas de tonoplasto de raízes e folhas de plantas de *V. unguiculata* (L.) Walp submetidas ao estresse salino e em condição controle foram isolados e a atividade de hidrólise da V-ATPase foram analisados. A figura 10 mostra a porcentagem de estímulo da atividade de hidrólise da V-ATPase em raízes e folhas, de plantas de Vita 3 e de Pérola em resposta ao estresse salino. Em plantas de *V. unguiculata* cv. Vita 3, a atividade V-ATPásica de ambos os órgãos, raiz e folhas, em condição de estresse aumentaram 290 e 440%, respectivamente. Na cultivar Pérola, o aumento da atividade ATPásica de raízes em decorrência da salinidade foi de 53%.

4.5 ESTUDO DA ANATOMIA DE ÁPICES RADICULARES

A anatomia do ápice de raízes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivar Vita 3 foi analisada em condição controle e de estresse salino (NaCl 100 mM) (Figura 11). As células meristemáticas das plantas sob condição controle contêm pequenos vacúolos

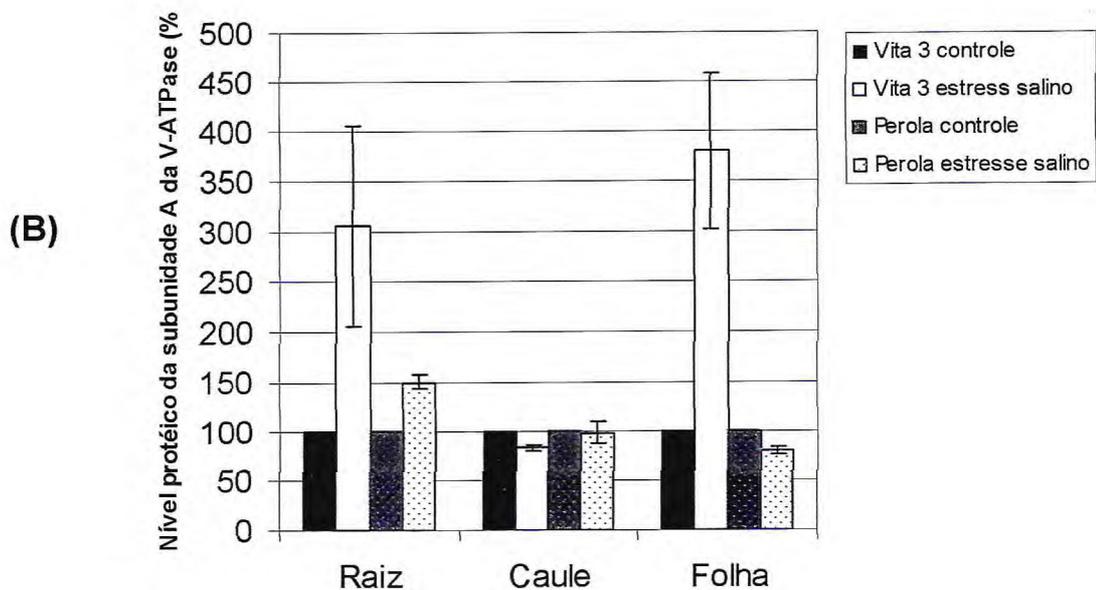
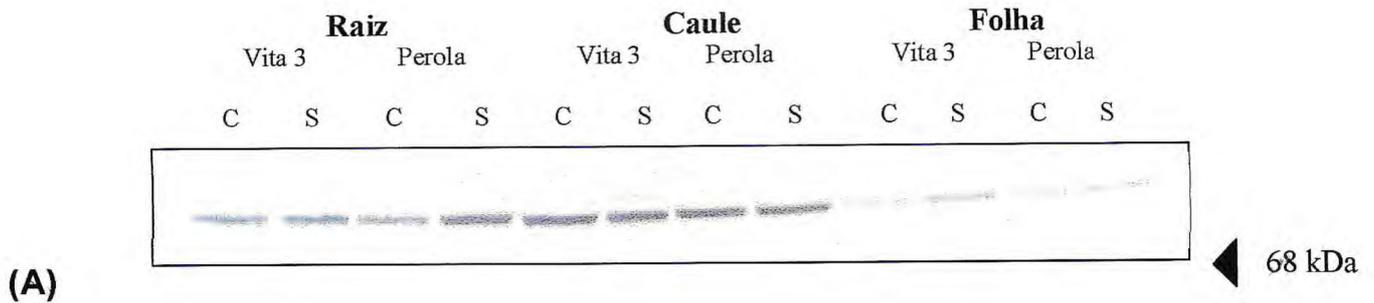


Figura 9. Análise dos níveis protéicos da subunidade A da V-ATPase em frações microsossomais de raízes, caules e folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivar Vita 3 e Pérola sob condição controle e de estresse salino. As amostras continham 10 μ g de proteína. (A) Western blot-bandas imunodetectadas com anticorpo contra a subunidade A da V-ATPase de *Mesembryathenum crystallinum*; (B) Análise quantitativa dos níveis protéicos da subunidade A nas membranas, determinada por densitometria através do programa de análise de imagem AIDA. Os dados quantitativos representam média de três experimentos independentes. As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 7. C-Controlle, S-Estresse salino.

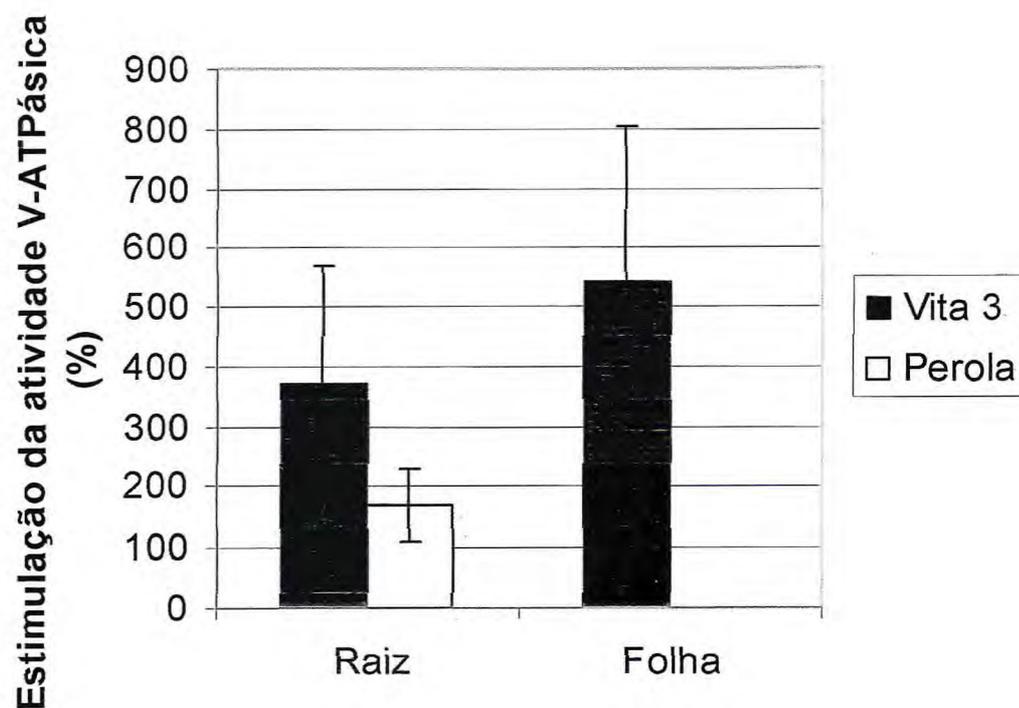


Figura 10. Análise da atividade de hidrólise da V-ATPase, através da estimulação da atividade (%), em vesículas enriquecidas em tonoplasto de raízes de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivar Vita 3 e Pérola e folhas da cv. Vita 3 sob condição de estresse salino. O meio de reação continha Tris-HCl 50 mM pH 7.0, $MgSO_4$ 2 mM, KCl 70 mM, Azida 5 mM, $NaMoO_4$ 0,2 mM, ATP 1 mM, proteína 30 μ g/mL, com e sem bafilomicina 200 η M. A atividade da V-ATPase foi considerada a atividade sensível à bafilomicina.

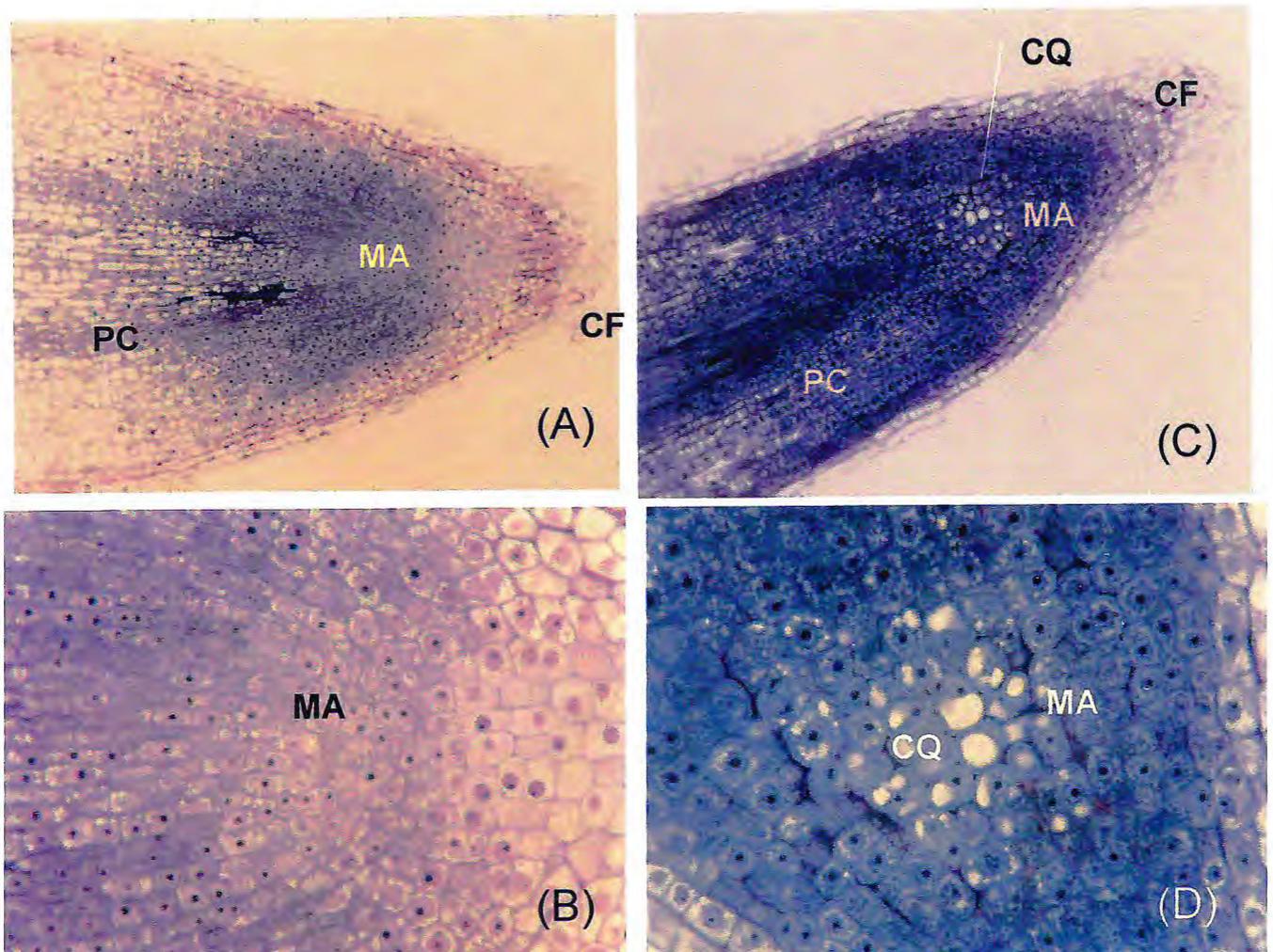


Figura 11. Corte longitudinal do ápice de raiz de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 3, mostrando o efeito do estresse salino no volume vacuolar de células meristemáticas. (A) e (B) Raiz de planta sob condição controle; (C) e (D) Raiz de planta sob condição de estresse salino; CF-Coifa, CQ-Centro quiescente, MA-Meristema apical, PC-Procâmbio. A e C (x125); B e D (x 400).

(Figura 11 A). Enquanto as células meristemáticas de plantas submetidas ao estresse salino, apresentam aumento do volume vacuolar, ocupando assim, a maior parte do volume da célula (Figura 11B). Essa vacuolarização devido à salinidade ocorreu principalmente nas células do centro quiescente.

4.6 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS DAS SUBUNIDADES DA V-ATPASE

4.6.1 ANÁLISE ATRAVÉS DE MACROARRANJO (MACRO ARRAY)

A figura 12 mostra os níveis de transcritos das subunidades A, B, C, D, E, F, G, H, a, c e d em folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp nas cultivares Vita 3 e Pérola, em resposta ao estresse salino (100 mM de NaCl) analisados através de Macroarranjo. Os níveis de transcritos de cada subunidade na condição controle foram considerados 100% e os níveis de transcritos em condição de estresse foram expressos em relação ao controle.

Os níveis de mRNA das subunidades A e B da V-ATPase aumentaram nas duas cultivares de 64 e 72% em Vita 3 e 364 e 357% em Pérola, respectivamente, revelando maior aumento na cultivar Pérola.

Os aumentos dos níveis de transcritos da subunidade C foram de 200% na cultivar Vita 3 e de 580% na cultivar Pérola. A quantidade de mRNA das subunidades D, E, F e G na cultivar Vita 3 diminuiu 51, 61,3, 41,3 e 46,3%, respectivamente. Já na cultivar Pérola, esses níveis aumentaram 44, 51, 89 e 58%, respectivamente. Os níveis de mRNA das subunidades H, a, c e d não variaram significativamente em relação ao controle em ambas as cultivares.

O grau de regulação dos níveis de transcritos em resposta ao estresse salino variou não somente em função das cultivares, mas também em função das próprias subunidades, revelando indução nas subunidades A, B, C, D, E, F e G na cultivar Pérola e nas subunidades A, B e C na cultivar Vita 3 e repressão nas subunidades D, E, F e G em Vita 3.

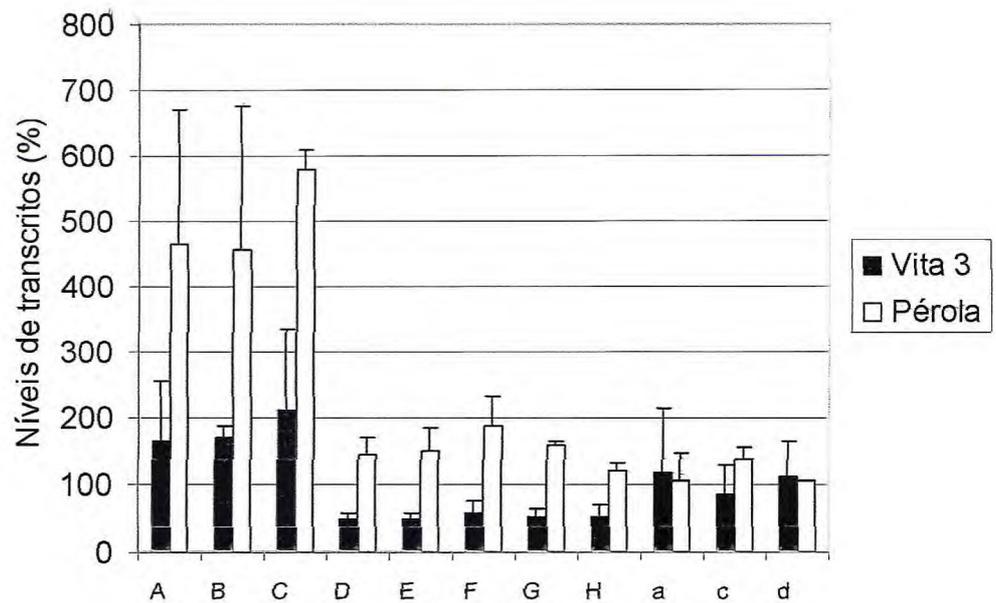


Figura 12. Níveis de transcritos das subunidades da V-ATPase de folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (cultivar Vita 3 e Pérola) em resposta aos estresse salino através de Macroarranjo. A quantidade relativa de transcritos foi normalizada com actina. Os níveis de transcritos das subunidades da V-ATPase de plantas em condição controle foram considerados como 100% e os de plantas sob condição de estresse foram expressos em função dos níveis das respectivas subunidades da V-ATPase de plantas controle. As condições experimentais são as mesmas descritas na figura 7. Os dados representam médias de três experimentos \pm desvio padrão.

4.6.1.1 ALINHAMENTO DE SEQÜÊNCIAS DA SUBUNIDADE A DA V-ATPASE

O alinhamento das seqüências da subunidade A da V-ATPase em *Vigna unguiculata* (cDNA parcial com 1123 pares de bases) e em *Mesembryanthemum crystallinum* (2396 pares de bases), mostrado na Figura 13, revelou 83% de identidade.

4.6.2 ANÁLISE ATRAVÉS DE RT-PCR

Os níveis de transcritos da subunidade A da V-ATPase de folhas da cv. Vita 3, foram analisados também através da técnica de RT-PCR. Os níveis de transcritos da subunidade A aumentaram em plantas expostas à salinidade (NaCl 100 mM) durante 1, 3 e 14 dias, sendo observado maior aumento no maior tempo de exposição (Figura 14).

4.7 ATIVIDADE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi analisada em raízes e folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 3 em condição controle e de estresse salino (Figura 15). A atividade dessa enzima nas raízes aumentou 40% em resposta ao estresse salino (100 mM) enquanto que nas folhas não houve diferença significativa entre as condições controle e estresse salino.

4.8 ATIVIDADE DA ENZIMA ASCORBATO PEROXIDASE (APX)

A figura 16 mostra a atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) em raízes e folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 3 em condição controle e de estresse salino (100 mM). A atividade APX diminuiu 34 % em raízes de plantas submetidas ao estresse salino comparada com a da condição controle. A atividade da APX em condição controle, em folhas, correspondeu a 15% da atividade em raízes e não mostrou alterações em resposta ao estresse salino.

```

Mesembryanthemum      CTTCTCTCTATATCACTCTCGCTCTCTCTCTCTAGGGGATTTCGATCGCTAATTCA 60
Vigna
Mesembryanthemum      ATCCAACCCCAAAATCCCTAACCTAGCTCCTCAGATCTCGTTACTCAACCCCCCGATTT 120
Vigna
Mesembryanthemum      TCCCGTTTCTTTGGTCAATCGGTCTCCAACATGCCGGCTGTTTATGGAGATCGCTTGAC 180
Vigna
Mesembryanthemum      CACTTTCGAGGATCCGAGAAGGAGAGCGAGTATGGTTACATTCGTAAGGTGTCCAGACC 240
Vigna
Mesembryanthemum      TGTCGTCTGTGCTGATGGAATGAATGGCGCTGCTATGTATGAATTGGTCCGTGTTGGATA 300
Vigna
Mesembryanthemum      TGACAATCTTATTGGAGAGATTATTGGTTAGAAAGGCGACTTCCACCATCCAAGTTTA 360
Vigna
Mesembryanthemum      TGAAGAACTGCTGGTTTGTGGTCAACGACCCTGTTCTCCGGACACACAAGCCATTGTC 420
Vigna
Mesembryanthemum      AGTCGAGCTCGGACCTGGAATTTTGGGAATATATTTGATGGCATTAGAGGCCACTAAA 480
Vigna
Mesembryanthemum      AACTATTGCTAAGAGGTCTGGTGTATCTATATCCCTCGTGGTGTGCTGTGCCCTCTCT 540
Vigna
Mesembryanthemum      AGACAAGGACGCATTTGGGAATTTGAGCCTAAGAAGATAGGCGAGGGGGATCTTTTGAC 600
Vigna
Mesembryanthemum      TGGTGGAGACTTATATGCTAAAGTTTACGAGAACAGTCTAATGGCGCATCGAGTGGCCCT 660
Vigna
Mesembryanthemum      TCCTCTGTATGCTATGGGCAAAATCACCTACATTGCACCTCCAGGGCAATACTCTATCCA 720
Vigna
GGCTCCTGATGCCATGGGAAAGATTACCTACATTGCACCCGCTGGCCAATATCTATAAC 60
*****
Mesembryanthemum      GGACACAGTCTTAGAAGTTGAGTTTCAAGGTGTGAAGAAGGAATTCACCATGCTTCAGTC 780
Vigna
GGTACTGTATTGGAAGTTGAGTTTCAAGGTGTGACAAAGAAATTCACCATGCTTCAGAC 120
***
Mesembryanthemum      TTGGCCCGTTCGTACACCCAGCCCTGTTGCATCAAACTTGTGCTGATACCCCTCTGCT 840
Vigna
CTGGCCTGTACGTACCCCAAGGCCTGTGCATCAAACTTGCAGCTGATACTCTCTCTCT 180
*****
Mesembryanthemum      TACTGGCCAGCGTGTCTTGTACGCTCTTTCCCTCTGTTCTTGGTGGAACTTGTGCCAT 900
Vigna
TACTGGTCAGCGTGTCTTGTATGCCCTTTTCCCTCAGTGTCTGGTGGGACCTGTGCCAT 240
*****
Mesembryanthemum      TCCTGGAGCTTTTGGGTGTGAAAAACTGTTATCAGTCAAGCACTTCCAACTACTCTAA 960
Vigna
ACCTGGAGCTTTTGGCTGTGGGAAAACAGTTATCAGTCAGGCTCTTCTAAGTATTCCAA 300
*****
Mesembryanthemum      CTCTGATGCTGTGGTTTATGTTGGTTGTGGAGAGAGAGAAATGAAATGGCAGAGGTGCT 1020
Vigna
TTCTGATGCTGTGTCTACGTGGTGTGGGAACTGGAATGAAATGGCAGAGGTCTCT 360
*****
Mesembryanthemum      CATGGATTCCTCAATFGACAATGACATTACCTGATGGACGTGAAGAATCTGTCAATGAA 1080
Vigna
CATGGATTTCCCAACTTACAATGACATTACCTGATGGTGTGGAAGAATCTGTCAATGAA 420
*****
Mesembryanthemum      ACGTACTACGCTGTGGCTAACACTTCAACATGCCTGTGGCGGCACGTGAGGCGTCCAT 1140
Vigna
GCGTACAACACTGGTGGCTAACACTTCAACATGCCGTGGCAGCCGTTGAAGCTTCAAT 480
*****
Mesembryanthemum      TTACACAGGTATTACAATAGCTGAATATTTAGAGATATGGCTACAATGTCAATGAT 1200
Vigna
TTATACAGGAATCACATTAGCTGAGTATTTAGAGATATGGGTTACAATGTCAATGAT 540
*****
Mesembryanthemum      GGCAGACTCACTTCTCGATGGGCAGAAAGCTCTGCGTGAATTTCCAGGACGATTTGGCGA 1260
Vigna
GGCTGATCTACATCTAGATGGCAGAAAGCATTGCCTGAAATCTCTGGACGACTGGCAGA 600
*****
Mesembryanthemum      AATGCCTGCAGATAGTGGATATCCTGCTTATCTAGCTGCTCGTTTGGCTTCTTTCTACGA 1320
Vigna
GATGCCCTGCAGATAGTGGATATCCTGCTTACCTTGTGCTGCTGTTTGGCTTCTTTCTATGA 660
*****
Mesembryanthemum      ACGTGCCGTAAGTAAATGTCTTGGTGGTCCAGAACGTACAGGAAGTGTCACTATTGT 1380
Vigna
ACGTGCTGGGAAAGTAAATGTCTTGGAGGCCCTGAACGTACCGGTAGTGTAAACAATTGT 720
*****
Mesembryanthemum      TGGTGTGTTTCTCCTCCTGGAGGAGATTTCTCTGATCCTGTACATCTGCCACTCTAAG 1440
Vigna
TGGTGTGTTTCCACCCTGGAGGAGATTTCTCAGATCCTGTGACATCTGCAACCTCAG 780
*****
Mesembryanthemum      TATTGTCCAGGTTTCTGGGTTTGGATAAGAAGCTGGCCCAAAGGAAACATTTCCCTC 1500
Vigna
CATAGTTCAGGTTTCTGGGTTTGGACAAAAGCTGCTCAGAGGAAGCACTTTCCTTC 840
*****
Mesembryanthemum      TGICAAGTGGCTTATTTCTTACTCAAATATACATCGGCTTTGGAACATTCTATGAGAA 1560
Vigna
GGTGAAGTGGCTTATTTCTTATTCAAAATCTCAACGGCACTCGAATCCTTTACGAACA 900
*****
Mesembryanthemum      ATTGCATCCTGATTTTATCAATATCAGGACCAAGGCCGTGAGGACTGCAGAGAGAAGA 1620
Vigna
ATTTGATCCAGATTTTATAAATAGGACTAAAGCTCGTGAAGTCTGCAAGAGAAGA 960
*****

```

```

Mesembryanthemum      TGATCTGAATGAAATTGTCCAGCTTGTCCGGGAAAGATGCATTGGCCGAGACAGACAAAAT 1680
Vigna                  TGACCTGAATGAAATTGTCCAGCTTGTGGGCAAGGATGCTTTAGCTGAAGGAGATAAGAT 1020
*** *****
Mesembryanthemum      CACCTTGGAGACCGCAAAGCTTTTGGAGGGAAGACTACCTTGCACAAAATGCGTTTACACC 1740
Vigna                  CACCTTAGAAACTGCGAAGCTTTTGGAGAGAGGATTATCTTGTCTCAAAATGCCTTCACACC 1080
*** ** * * * * *
Mesembryanthemum      ATATGACAAAATTTGCCCGTTCGTTTACAAGTCAGTCTGGATGATGCGCAACATCATPCA 1800
Vigna                  ATATGACAAAATTCGTCCCTTC---TACAAGTCTGTTTGGATGATGCG----- 1125
***** ** * * * * *
Mesembryanthemum      TTTCTATAAATTTGGCTAATAAGGCGGTGGAGCGTGGTGCTGGTTCAGATGGCCAAAAAAT 1860
Vigna                  -----
Mesembryanthemum      TACCTACAGCTTGATCAAGCTTCGACTGGGAGATCTCTTCTACCGTTTAGTGTCTCAAAA 1920
Vigna                  -----
Mesembryanthemum      ATTCGAGGACCCTGCTGAAGGAGAAGACTCTCGTCGCAAAATTCAGAAGTTGTACGA 1980
Vigna                  -----
Mesembryanthemum      GGATCTCTCTGCCGATTCGCAACCTCGATGACGAAACCCGATAATCGGAGCACAGCCC 2040
Vigna                  -----
Mesembryanthemum      CAAGTTCACAGTTTTCTGGTAAACATTAGAGCTGTTGTTTCTCTCGCCACTTGTACAAG 2100
Vigna                  -----
Mesembryanthemum      AGAAGCAAGAGCGCGTGCACAGACAGMMKKTGCKMNTTYTGAAGCCTTGTGTTTGCCTTGT 2160
Vigna                  -----
Mesembryanthemum      GTTTTFCCCCATTTCCAGGGCTATATGTCTGGATGCAGTGTGCAATCTTTGACAATAT 2220
Vigna                  -----
Mesembryanthemum      TTTC TACTAGTACTACTACTACTATTGGTTTTTGGTACAGAATAAGATCTCCTTTTCTAT 2280
Vigna                  -----
Mesembryanthemum      GTTTCATGGTGAAAATAAGGTCTGTGTATGAGTTGGATGTGAATTCGAGGCCGGGAA 2340
Vigna                  -----
Mesembryanthemum      GTTTGTACGTTTGATTCTCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2396
Vigna                  -----

```

Figura 13. Alinhamento da seqüência de nucleotídeos da subunidade A da V-ATPase de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (AccNr.DQ056751) e *Mesembryanthemum crystallinum* (AccNr. AJ276326).

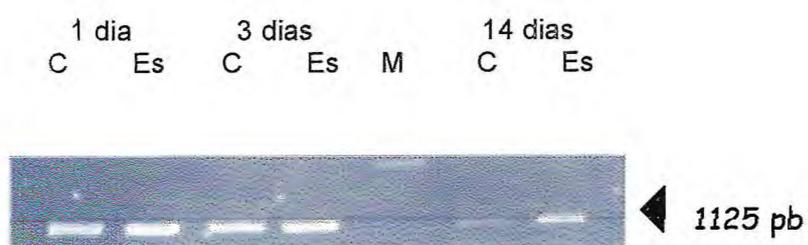


Figura 14. Análise semi-quantitativa através de RT-PCR de transcritos da subunidade A da V-ATPase de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 3 em resposta ao estresse salino (NaCl 100 mM) durante 1, 3 e 14 dias. C-Plantas controle; Es-Plantas submetidas ao estresse salino. M-Marcador

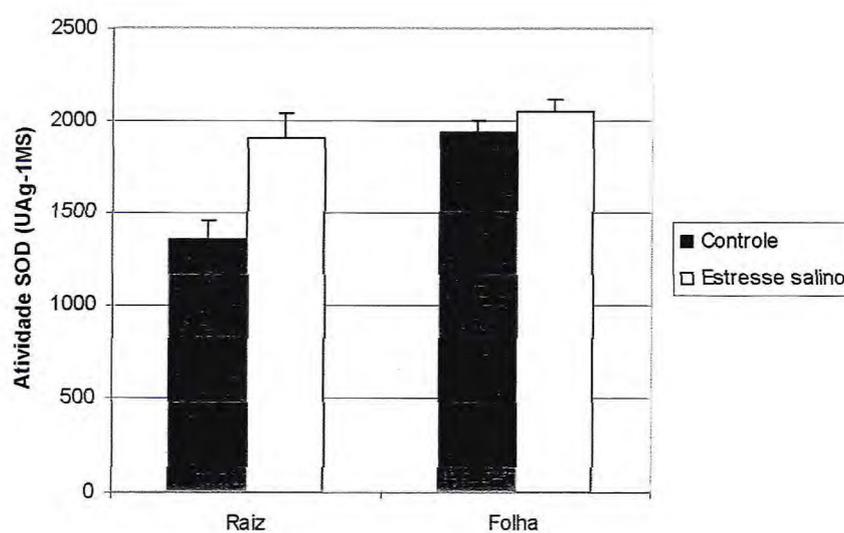


Figura 15. Atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) em raízes e folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivar Vita 3 em condição controle e de estresse salino (NaCl 100 mM). As condições ambientais são as mesmas descritas na figura 7. Os dados quantitativos representam média de três experimentos independentes.

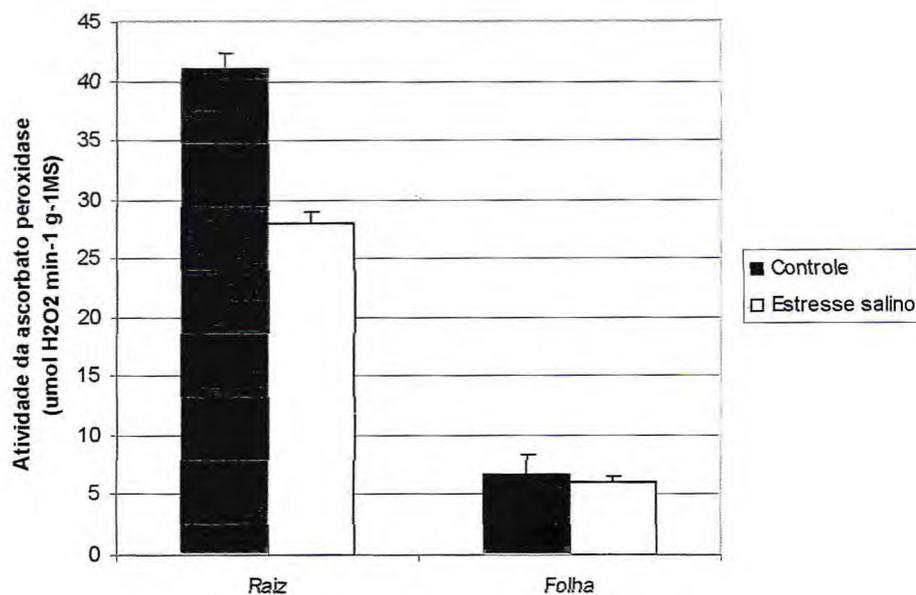


Figura 16. Atividade da enzima Ascorbato peroxidase (APX) em raízes e folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivar Vita 3 em condição controle e de estresse salino (NaCl 100 mM). As condições ambientais são as mesmas descritas na figura 7. Os dados quantitativos representam média de três experimentos independentes.

4.8 ANÁLISE DOS NÍVEIS PROTÉICOS DA PEROXIRREDOXINA II-C E PEROXIRREDOXINA Q

A quantidade relativa da peroxirredoxina-C (Prx II-C) e peroxirredoxina Q de folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivares Vita 3 e Pérola, sob condição controle e de estresse salino (100 mM de NaCl) foi analisada através de Western blot. Foram utilizadas frações de endomembranas contendo 10 µg de proteína e anticorpo contra a Prx-C e Prx-Q de *Arabidopsis thaliana*. A figura 17 mostra que a quantidade relativa da Prx-C aumentou 40% na cultivar Vita 3 e diminuiu 60% na cultivar Pérola em resposta ao estresse salino. Já os níveis de Prx-Q diminuíram 80 e 60% nas cultivares Vita 3 e Pérola, respectivamente, em decorrência da salinidade (Figura 18).

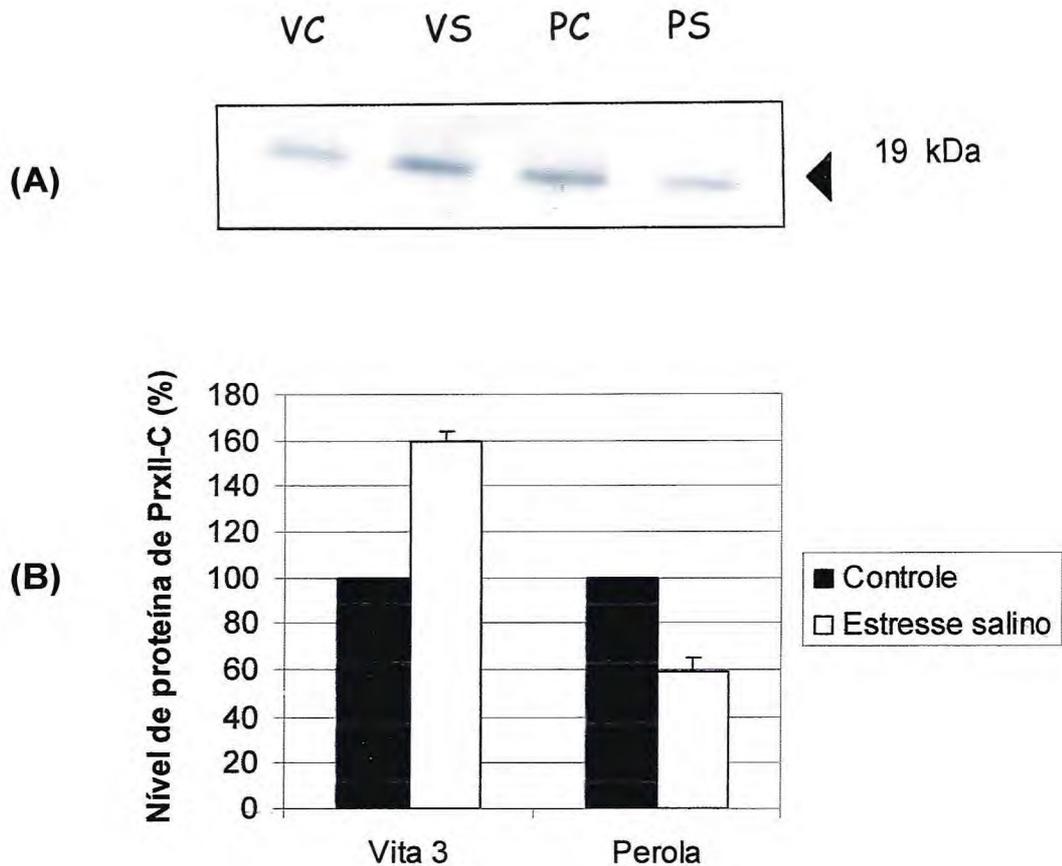


Figura 17. Análise dos níveis protéicos da Peroxirredoxina C (Prx II-C) em extratos totais de folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivares Vita 3 e Pérola sob condição controle e de estresse salino (100 mM). As amostras continham 10 μ g de proteína. (A) Western blot-bandas imunodetectadas com anticorpo contra a Peroxirredoxinas de *Arabidopsis thaliana*; (B) Análise quantitativa dos níveis protéicos da Prx II-C nas membranas, determinada por densitometria através do programa de análise de imagem AIDA. As condições ambientais são as mesmas descritas na figura 7. Os dados quantitativos representam média de três experimentos independentes. VC- Vita 3 controle; VS- Vita 3 estresse salino; PC-Pérola controle; PS- pérola estresse salino.

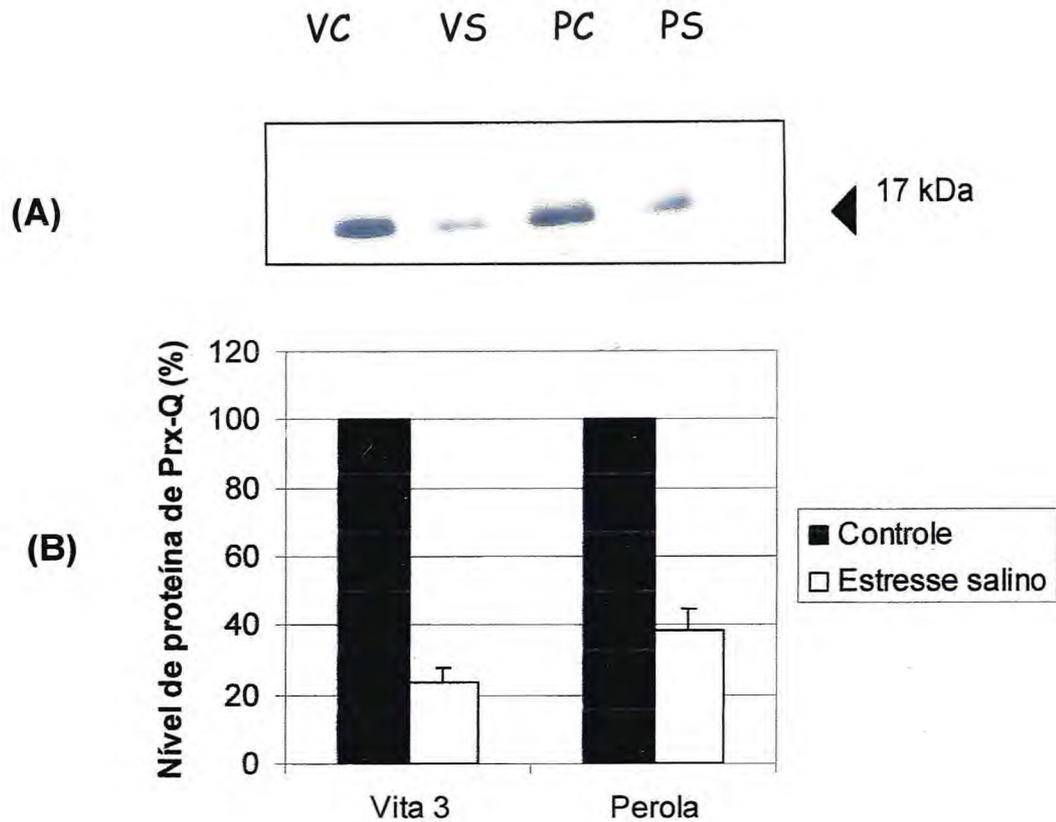


Figura 18. Análise dos níveis protéicos da Peroxirredoxina Q (Prx-Q) em extratos totais de folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivares Vita 3 e Pérola sob condição controle e de estresse salino (100 mM). As amostras continham 10 μ g de proteína. (A) Western blot-bandas imunodetectadas com anticorpo contra a Peroxirredoxinas de *Arabidopsis thaliana*; (B) Análise quantitativa dos níveis protéicos da Prx-Q nas membranas, determinada por densitometria através do programa de análise de imagem AIDA. As condições ambientais são as mesmas descritas na figura 7. Os dados quantitativos representam média de três experimentos independentes. VC-Vita 3 controle; VS- Vita 3 estresse salino; PC-Pérola controle; PS- pérola estresse salino.

5 DISCUSSÃO

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), também conhecido como feijão de corda, é utilizado como uma importante fonte de alimento para populações em todo o Brasil, principalmente na região Nordeste. Como o estresse salino é um dos principais fatores que limita a sua produtividade, o estudo dos mecanismos fisiológicos na adaptação do feijão de corda às condições de estresse salino, é uma ferramenta útil na identificação dos fatores responsáveis pela tolerância e/ou susceptibilidade dessa planta.

A salinidade afetou o desenvolvimento de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp que foi avaliado através do efeito no peso fresco das diferentes partes das plantas de ambas as cultivares (Figura 6). As folhas e as raízes foram os órgãos mais atingidos. Contudo, foram as folhas que apresentaram maiores danos no seu desenvolvimento nas condições experimentais testadas, isto é, 100 mM de NaCl durante 14 dias. O efeito da salinidade foi distinto em Vita 3 e Pérola sendo observado uma inibição média no peso fresco das raízes de 51 e 67%, dos caules de 31 e 50% e das folhas de 51 e 72%, respectivamente.

Nossos resultados são concordantes com os de Munns (2002) que mostrou que o desenvolvimento das folhas é mais reduzido do que o crescimento das raízes em plantas submetidas às condições de estresse salino.

Estudos prévios mostraram que o desenvolvimento de plantas de *V. unguiculata* foi afetado pela salinidade (FERNANDES DE MELO et al., 1998; SILVEIRA et al., 2001). Otoch et al. (2001) mostraram que o crescimento de plântulas estioladas de *V. unguiculata* cv. Vita 3, semeadas em presença de 100 mM de NaCl, foi inibido pela salinidade sendo o epicótilo a parte mais afetada. De acordo com Costa et al. (2003), a cultivar Vita 3 apresentou tolerância intermediária à salinidade (100 mM por 17 dias), em comparação a outras cultivares da mesma espécie. Portanto, a definição do grau de tolerância das plantas a estresses ambientais carece de especial atenção diante da relatividade dos mecanismos de ajustamento metabólico induzidos face ao efeito do tempo de exposição ao estresse e às condições ambientais, em diferentes espécies e cultivares. Assim, o efeito da salinidade em *Vigna unguiculata* é variável em

função das condições experimentais. As medidas de crescimento (dados não mostrados) e as de peso fresco das diferentes partes das plantas de *V. unguiculata* em ambas as cultivares (Figura 6) mostraram que a cultivar Pérola foi mais sensível ao estresse salino do que a cultivar Vita 3 em todos os tratamentos com sal e em quase todos os órgãos da planta estudados.

Sabe-se que quando a concentração de NaCl no ambiente que circunda as plantas aumenta, o alto nível extracelular do Na^+ (relativo ao citosol) e o $\Delta\Psi$ negativo no interior da célula, estabelece um gradiente termodinâmico facilitando o influxo de Na^+ . Apesar desse mecanismo de influxo de Na^+ não ser conhecido, o Na^+ parece agir como um competidor da captação do K^+ , o que leva a crer que os mecanismos de captação de ambos os cátions sejam semelhantes (NIU et al., 1995; WATAD et al., 1991). As raízes de plantas utilizam dois sistemas para a aquisição de K^+ . O primeiro sistema tem alta afinidade por esse íon (K_m de 10-30 μM), sendo capaz de captar baixas concentrações e não é inibido por Na^+ (RAINS; EPSTEIN, 1967). Já o segundo sistema media a captação de altas concentrações de K^+ externo (na faixa de mM) e tem pouca seletividade K^+/Na^+ . O influxo de Na^+ para o interior das plantas ocorre mais provavelmente através do sistema de baixa afinidade (RAINS; EPSTEIN, 1967). Dessa forma, a toxicidade metabólica do Na^+ parece ser um resultado da sua capacidade de competir com o K^+ pelos seus sítios de ligação que são essenciais para a função celular. Mais de 50 enzimas são ativadas por K^+ e Na^+ não pode substituí-lo nessa função (BHANDAL; MALIK, 1988). Assim, altos níveis de Na^+ ou altas relações Na^+/K^+ podem afetar vários processos enzimáticos no citoplasma. Além disso, a síntese de proteínas requer altas concentrações de K^+ , pois o íon K^+ é importante para a ligação do tRNA aos ribossomos (BLAHA et al., 2000). A interrupção da síntese protéica por elevadas concentrações de Na^+ parece ser uma importante causa de prejuízo causado pelo Na^+ .

O conteúdo dos íons Na^+ e K^+ foram analisados em plantas de *V. unguiculata* (L.) Walp (cv. Vita 3 e Pérola) em resposta ao estresse salino. O teor de Na^+ nas raízes e nas folhas de ambas as cultivares aumentou em decorrência da exposição das plantas à salinidade (figura 7). Os maiores aumentos foram encontrados na cultivar Pérola, que foi considerada mais sensível ao estresse salino que a cultivar

Vita 3. Resultados semelhantes foram encontrados por Costa et al. (2003) onde a análise dos íons inorgânicos nas folhas de diferentes cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp (Vita 3, Pitiúba, Vita 5, dentre outras) mostrou que os teores de Na^+ aumentaram de forma significativa em resposta à salinidade (75 mM de NaCl por 17 dias), sendo que a cultivar que mais acumulou foi a mais sensível à salinidade, avaliada através de medidas de peso seco.

Fernandes de Melo et al. (1998) demonstraram que a capacidade de manter íons Na^+ em maior quantidade nas raízes minimizando o transporte desse íon para a parte aérea da planta é uma resposta característica de plantas de *V. unguiculata* (L.) Walp submetidas ao estresse salino. De fato, a concentração de Na^+ em raízes de plantas de feijão-de-corda submetidas ao estresse salino foi maior que a concentração de Na^+ em folhas (figura 7). Entretanto, o aumento da concentração de Na^+ devido ao estresse salino, foi mais expressivo em folhas (13,5 vezes na cultivar Vita 3 e 14,5 na cultivar Pérola) que em raízes (3,5 vezes na cultivar Vita 3 e 10,6 vezes na cultivar Pérola).

Apesar da salinidade geralmente induzir uma diminuição no conteúdo de K^+ em plantas não-halófitas, contribuindo mais ainda para a toxicidade do sal e diminuição do crescimento de plantas (BEM-HAYYIM et al., 1987; NAKAMURA et al., 1990; NIU et al., 1995), a concentração de K^+ nas raízes e nas folhas das duas cultivares de *V. unguiculata* não apresentou mudanças significativas em resposta à salinidade (figura 8). Esses resultados estão em consonância com os encontrados por Costa et al. (2003) que mostraram que a salinidade (100 mM NaCl durante 17 dias) não induziu alteração significativa no teor de K^+ nas folhas das cultivares Vita 5, Epace 10 e TVU de *V. unguiculata*. Já as cultivares Vita 3 e pitiúba apresentaram uma pequena diminuição desses teores. De acordo com os parâmetros fisiológicos analisados por Costa et al. (2003), as cultivares Pitiúba e Vita 5 foram consideradas as mais tolerantes e a cultivar TVU a menos tolerante.

O estresse salino aumentou a relação Na^+/K^+ em ambas as cultivares (Tabela IV). Entretanto, os maiores aumentos tanto em raízes como em folhas foram encontrados na cultivar menos tolerante à salinidade (Pérola). Resultados semelhantes foram encontrados por Costa et al. (2003), que observou aumentos significativos na

relação Na^+/K^+ em resposta á salinidade, em folhas de diferentes cultivares de *Vigna unguiculata*, sendo os maiores aumentos encontrados na cultivar menos tolerante (TVU).

A concentração citosólica de Na^+ em plantas halófitas e não-halófitas, geralmente, não excede 150 mM, porque nessas condições, uma variedade de reações metabólicas poderia ser inibida (FLOWERS et al., 1986; WANG et al., 2001). Algumas plantas halófitas possuem glândulas de sal nas suas folhas e outras compartimentalizam o Na^+ , íon tóxico, nos vacúolos (HASEGAWA et al., 2000). Dessa forma, os sistemas de transporte na membrana que regulam a homeostase iônica no citoplasma (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) e a acumulação de íons nos vacúolos podem ser considerados de crucial importância para a adaptação de plantas às condições salinas (HASEGAWA et al., 2000; MIMURA et al., 2003; NIU et al., 1995; SERRANO et al., 1999). No processo de compartimentação intracelular, o Na^+ ao entrar nas células é bombeado para o interior do vacúolo evitando que sua concentração aumente no citoplasma. O transporte de Na^+ do citoplasma para o interior do vacúolo através do contra-transportador Na^+/H^+ (BARKLA et al., 1995; FUKUDA et al., 1998) é dependente da atividade da V-ATPase e da V-PPase que estabelecem um gradiente eletroquímico de H^+ entre o citosol e o interior do vacúolo, utilizando energia proveniente do ATP ou PPI, respectivamente (BINZEL; RATAJCZAK, 2001). Sabe-se que a V-PPase parece não exercer papel importante na adaptação de plantas ao estresse salino, apesar de ser fundamental na adaptação de plantas à outros estresses ambientais, tais como baixas temperaturas e anóxia, estresses que induzem um aumento nos níveis protéicos e de transcritos dessa enzima (CARYSTINOS et al., 1995; DARLEY et al., 1995). Em relação à adaptação de plantas ao estresse salino, a V-ATPase parece ser a enzima chave nos mecanismos de ajustamento como já foi mostrado através de aumentos de atividade, proteína e/ou transcrito(s) em plantas mais tolerantes ao sal (GOLLDACK & DIETZ, 2001; KLUGE et al., 2003; LÖW et al., 1996; OTOCH et al., 2001; RATAJCZAK et al., 1994; TSIANTIS, 1996; ROCKEL et al., 1998; WANG, LÜTTGE; RATAJCZAK, 2001).

A figura 9 mostra a avaliação dos níveis protéicos da subunidade catalítica da V-ATPase (subunidade A) nas diferentes partes das plantas de ambas as

cultivares (Vita 3 e Pérola) em resposta ao estresse salino (100 mM de NaCl). O perfil de expressão não mostrou alteração significativa no caule e revelou aumento médio de 2 vezes nas raízes de Vita 3 e de 0,5 vezes nas raízes de Pérola. Entretanto, foram nas folhas onde se detectou um perfil diferencial na expressão protéica entre as cultivares. O aumento médio de expressão nas folhas de Vita 3 foi de 280% em relação as plantas controle e as folhas de plantas estressadas da cultivar Pérola revelou um decréscimo de 20% na sua expressão quando comparada às plantas não estressadas. Esse aumento nos níveis protéicos da subunidade A da V-ATPase, em resposta à salinidade, encontrado somente na cultivar Vita 3, parece justificar a maior tolerância dessa cultivar. O Na⁺ encontrado nas folhas, pode ter sido compartimentalizado em maior escala no interior do vacúolo nas plantas de Vita 3, demonstrando que nessa cultivar os efeitos deletérios do Na⁺ poderiam ter sido minimizados. Ao contrário, em plantas da cultivar Pérola, os íons Na⁺ poderiam ter se concentrado em maior quantidade no citoplasma sendo mais tóxico para a planta e causando maiores danos no metabolismo.

O efeito da salinidade na quantidade relativa das subunidades da V-ATPase é pouco conhecido. Otoch et al (2001) verificaram a quantidade relativa da subunidade A da V-ATPase de hipocótilos de plântulas estioladas de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 sob condição de estresse salino (100 mM) durante 3 e 7 dias, revelando aumento da expressão protéica apenas com 7 dias. Já em plantas de *Nicotiana tabacum*, os níveis relativos da subunidade A diminuíram devido à salinidade (REUVENI et al.,1990) e em plantas de *Hordeum vulgare* e em cultura de células de *D. carota*, a salinidade não exerceu nenhum efeito na quantidade de proteína dessa subunidade.

A figura 10 mostra a ativação da atividade de hidrólise da V-ATPase nas raízes das duas cultivares revelando um paralelismo entre aumento da expressão protéica (Figura 9) e da atividade (figura 10). Assim, o aumento da atividade de hidrólise parece refletir a maior quantidade da subunidade catalítica de enzima na condição de estresse. Constata-se igualmente um paralelismo entre os estímulos das atividades de hidrólise das folhas e das raízes de Vita 3 (Figura 10) e as respectivas expressões protéicas o que nos permite sugerir que a atividade de hidrólise nas folhas

da cultivar Pérola de plantas estressadas seja menor ou igual aquela de plantas controle.

Resultados semelhantes aos da cultivar Vita 3 foram obtidos com a V-ATPase de folhas da halófito facultativa *Mesembryanthemum crystallinum*, que também aumentou sua atividade em resposta ao tratamento salino. (RATAJCZAK et al., 1994; TSIANTIS et al., 1996; DIETZ et al., 2001). A atividade ATPásica de raízes de plantas de *Vigna radiata* também aumentou em resposta à exposição das plantas a 100 mM de NaCl (NAKAMURA et al., 1990). Convém salientar, que embora um grande número de trabalhos mostre que a V-ATPase é a enzima chave nos mecanismos de adaptação ao estresse salino ainda há controvérsias em relação ao efeito do NaCl. Colombo e Cerana (1993) mostraram que a atividade V-ATPásica de *Daucus carota* não foi afetada pela salinidade. Por outro lado, os trabalhos de Ballesteros et al. (1997) e Löw e Rausch (1996) com raízes de girassóis e de suspensão de células de *Daucus carota*, respectivamente, mostraram aumento da atividade de transporte de H⁺ sem alteração na atividade de hidrólise.

Na maior parte das células maduras de plantas superiores, o grande vacúolo central ocupa quase 90% do volume celular total, dessa forma, é muito difícil medir acuradamente mudanças no volume vacuolar. Entretanto, nas células meristemáticas da região apical da raiz, os vacúolos ocupam uma menor proporção do volume celular e mudanças são mais facilmente medidos (MIMURA et al., 2003). O crescimento e a diferenciação da raiz são controlados pela atividade do meristema apical, uma região de tecido meristemático, do ápice da raiz, que é capaz de originar todos os tecidos da raiz. Como a região apical da raiz possui a maior taxa de crescimento, essas células devem adaptar-se rapidamente ao estresse salino para continuar desempenhando suas funções.

O volume vacuolar de células meristemáticas da região apical de raízes de plantas de *V. unguiculata* cultivar Vita 3 foi analisado, em condição controle e de estresse salino (100 mM de NaCl). O estudo da anatomia dessa região mostrou que o volume vacuolar de células meristemáticas da região do centro quiescente aumentou em plantas expostas à salinidade (100 mM de NaCl), em comparação com as plantas em condição controle (figura 11). O centro quiescente é uma região central de células

que raramente se dividem. Estudos com microscopia eletrônica revelaram que as células do meristema apical possuem poucos vacúolos e geralmente não são grandes.

Mimura et al. (2003), também verificaram aumento do volume vacuolar de células de raízes de cevada, em resposta à exposição das plantas à 300 mM de NaCl por 8 horas. Já em plantas de ervilha e tomate, sensíveis ao sal, não foram observadas grandes mudanças no volume vacuolar sob condições de estresse salino e os pequenos vacúolos não mudaram seu volume após tratamento com 50 ou 150 mM após 24 horas (MIMURA et al., 2003). Em suspensão de cultura de células de *Bruguiera sexagula* tratadas com 150 mM de NaCl por 24 horas, o volume dos vacúolos aumentou marcadamente. Além disso, o tratamento de células com solução de sorbitol (275 mM), osmolaridade correspondente a 150 mM de NaCl, não induziu aumento rápido no volume vacuolar (MIMURA et al., 2003). Dessa forma, o aumento do volume vacuolar observado em raízes de plantas de *Vigna unguiculata* em resposta ao estresse salino, parece estar diretamente relacionado com a acumulação de Na⁺ nos vacúolos, como uma estratégia da planta de minimizar os danos da acumulação desse íon no citosol.

Os níveis de transcritos das subunidades A, B, C, D, E, F, G, H, a, c e d da V-ATPase de *Vigna unguiculata* (L.) Walp foram analisadas através de macroarranjo (Figura 12). Apesar dos cDNAs presentes na membrana serem provenientes de plantas de *M. crystallinum*, ocorreu hibridização do cDNA fixado na membrana com as amostras de cDNA de plantas de *V. unguiculata*, o que parece indicar que as seqüências dessas subunidades devem ser bem conservadas. De fato, estudos indicam que a V-ATPase é uma enzima bastante conservada entre diversos organismos (STEVENS; FORGAC, 1997). Alinhando-se a seqüência nucleotídica parcial da subunidade A da V-ATPase de *V. unguiculata* (AccNr.DQ056751) com a seqüência da subunidade A da V-ATPase em *Mesembryanthemum crystallinum* (AccNr. AJ276326) observou-se alto grau de homologia, entre as duas seqüências, o que justifica a capacidade de hibridização entre os cDNAs de *V. unguiculata* e *M. crystallinum* (figura 13).

A análise da expressão de transcritos das subunidades da V-ATPase, através da técnica de macroarranjo, em resposta ao estresse salino em folhas de plantas de *V. unguiculata*, revelou que houve indução de expressão nas subunidades A,

B e C em ambas as cultivares e nas subunidades D, E, F e G na cultivar Pérola e repressão nas subunidades D, E F e G em Vita 3. Não houve variação nos níveis de mRNA das subunidades H, a, c e d em ambas as cultivares (Figura 12). Esses dados sugerem que o grau de expressão das diferentes subunidades da V-ATPase, em resposta ao estresse salino, em ambas cultivares não está sujeito a uma via de regulação coordenada.

Os níveis de transcritos da subunidade c bem como das subunidades A e B em raízes e folhas jovens de plantas de *M. crystallinum* (4 semanas) submetidas a 8 horas de tratamento salino (400 mM de NaCl), aumentaram (LÖW et al., 1996). A ativação coordenada de transcritos das subunidades A, B, E, F, G e c da V-ATPase de folhas de plantas de *M. crystallinum* (5 e 10 semanas) adaptadas ao estresse salino foi ainda observada por Golldack & Dietz (2001). Tsiantis et al. (2006) também observaram ativação nos transcritos da subunidade c da V-ATPase em folhas e raízes de plantas de *M. crystallinum* de 6-semanas tratadas com 350 mM de NaCl por 24 horas. Löw et al. (1996) mostraram que os níveis de mRNA da subunidade c da V-ATPase aumentaram em folhas expandidas de plantas de *M. crystallinum* (4 semanas) após 8 horas de tratamento com 400 mM de NaCl, entretanto, não foi observado nenhum aumento nos níveis de transcritos das subunidade A e B. Estes dados indicaram que a regulação não coordenada dos transcritos das subunidades da V-ATPase parece ter sido uma resposta imediata das plantas de *M. crystallinum* ao estresse salino.

Ao contrário das plantas halotolerantes que apresentam aumento da expressão gênica da V-ATPase quando tratadas com sal, as plantas glicófitas geralmente não mostram tal regulação. Em tomate, os níveis de mRNA da subunidade A aumentaram transitoriamente, sob condição de estresse salino, mas com três dias de tratamento os níveis de transcritos diminuíram alcançando os níveis da condição controle (BINZEL, 1995). Diferentemente, análise dos níveis de mRNA da subunidade A da V-ATPase em folhas de plantas de Vita 3 sob condição de estresse salino (Figura 14), mostrou que a quantidade de transcritos já aumentou após 24 horas de exposição a 100 mM de NaCl e esse aumento não parece ser transitório, uma vez que após 3 e 14 dias de estresse os níveis continuaram acima dos da condição controle.

Em plantas de cevada expostas a 300 mM de NaCl, a expressão de transcritos da subunidade E aumentou levemente apenas nas raízes (DIETZ et al., 1995). A expressão de transcritos da subunidade D da ATPase vacuolar de *Arabidopsis thaliana* não foi modificada pelo tratamento salino (KLUGE et al., 1999). Interessantemente, plântulas de *M. crystallinum* que não são halotolerantes não mostraram mudanças nos níveis de transcritos das subunidades A, B, E, F e c da V-ATPase em condição de estresse salino (GOLLDACK; DIETZ, 2001). Segundo Dietz et al. (2001), a habilidade de responder ao estresse salino com mudanças na expressão dos genes da ATPase vacuolar pode ser uma característica de plantas tolerantes ao sal.

Estudos realizados por Gollack e Dietz (2001), através de hibridização e de detecção histoquímica, mostraram expressão de transcritos e de proteína da subunidade E em condição controle, em todos os tipos de células nos tecidos de raízes e de folhas de plantas de *M. crystallinum*. Contudo, em condição de estresse salino, ocorreu um declínio na expressão da subunidade E nas células do córtex e do cilindro vascular da raiz enquanto que nas folhas, ocorreu um aumento principalmente na região que circunda o cilindro vascular. Dessa forma, Gollack e Dietz (2001) mostraram que a expressão da V-ATPase em resposta ao estresse salino é regulada diferentemente em células e em tecidos específicos e que esses níveis de transcritos e de proteínas provavelmente refletem envolvimento de vários tipos de células e de tecidos no transporte e na acumulação de sódio no vacúolo através da ação da V-ATPase.

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que os genes que codificam as diferentes subunidades da V-ATPase em folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (cv. Vita 3 e Pérola) parecem ser regulados independentemente em resposta ao estresse salino em cada uma das cultivares (Figura 12). A análise dos níveis de transcritos da maioria das subunidades da V-ATPase de folhas da cultivar Pérola revelou regulação por indução em resposta à salinidade, mostrando valores superiores aos obtidos pela cultivar Vita 3 (mais tolerante ao estresse) inclusive na subunidade A. Assim, sugere-se que a resposta da cultivar Pérola ao estresse salino no tocante ao aumento de transcritos das subunidades da V-ATPase seja tardia. Dessa

forma, justifica-se o baixo teor protéico da subunidade A e conseqüentemente a baixa atividade catalítica (figura 9). Como as folhas de plantas da cv. Pérola já sofreram a ação deletéria do excesso de NaCl por duas semanas, essa regulação tardia parece não ser eficaz na defesa da planta contra o excesso de Na⁺, através da compartimentação desse íon no vacúolo, pela ação da V-ATPase.

Sobreira (2003) também observou regulação tardia nos níveis de transcritos da subunidade A da V-ATPase de uma cultivar de *Vigna unguiculata* em resposta à salinidade. O estudo desses transcritos em plântulas das cultivares Vita 3 e Vita 5 em resposta ao estresse salino (NaCl 100 mM durante 7 dias) revelou aumento somente na cultivar Vita 5 (menos tolerante). Entretanto, uma análise temporal desses transcritos, revelou que a cultivar Vita 3 responde com aumento desses níveis com 3 dias de estresse, enquanto a cultivar Vita 5 não se altera nos primeiros dias de estresse e mostra aumento somente com 7 dias de exposição à salinidade.

Em muitas plantas, o estresse oxidativo pode estimular a síntese de metabólitos antioxidantes e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes. Assim, plantas tolerantes ou aclimatadas ao estresse podem conter altas concentrações de antioxidantes para minimizar os prejuízos causados pelas EROs. Estudos do papel dessas enzimas na tolerância ao estresse oxidativo, utilizando mutantes que superexpressam proteínas antioxidantes, estão sendo realizados e os resultados têm mostrado que a localização subcelular influencia os papéis desempenhados por esses metabólitos ou enzimas antioxidantes na detoxificação celular (BUCHANAN, GRUISSEM; JONES, 2000). Dessa forma, é importante para a sobrevivência das plantas que os metabólitos e as enzimas antioxidantes possam trabalhar em co-operação fornecendo uma melhor defesa e a regeneração das formas reduzidas ativas (BLOKHINA; VIROLAINEN; FAGERSTEDT, 2003). Sabendo-se que estresse salino induz estresse oxidativo foi feita também uma abordagem experimental no tocante ao papel de enzimas antioxidantes em resposta à salinidade nas duas cultivares.

Os resultados obtidos através dos ensaios de atividade das enzimas superóxido dismutase e ascorbato peroxidase de folhas de plantas de *V. unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 3 submetidas ao estresse salino (figuras 15 e 16), sugerem que as referidas enzimas não foram efetivas no seqüestro de radicais livres gerados pelo

estresse oxidativo. Resultados similares foram obtidos por Cavalcanti et al. (2004), que estudando folhas de plantas de *V. unguiculata* sob condição de estresse salino e osmótico afirmaram que as enzimas SOD, catalase e peroxidase não conferiram proteção contra o estresse oxidativo gerado pela salinidade. Por outro lado, nossos resultados mostraram que a atividade da SOD parece ter sido importante na proteção contra o estresse oxidativo em raízes, apesar da atividade da APX ter diminuído em resposta ao estresse salino. Esses resultados contrastam com os resultados obtidos por Cavalcanti et al. (2006), no qual a atividade da SOD de raízes de *V. unguiculata* diminuiu em função da exposição de plantas a 200 mM de NaCl por 12 dias. Entretanto, resultados controversos podem refletir as diferentes condições experimentais as quais as plantas foram submetidas.

Os níveis protéicos das peroxirredoxinas II-C e Q em folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita e Pérola mostraram diferentes regulações em resposta ao estresse salino (Figuras 17 e 18). Os níveis relativos da Prx II-C aumentaram em folhas da cv. Vita 3 e diminuíram em folhas da cv Pérola (Figura 17). Já os níveis relativos da Prx Q diminuíram nas duas cultivares em resposta ao estresse salino (Figura 18). Essa diferença na regulação de ambas as Prx, em resposta ao estresse salino, é esperada vez que a Prx II-C, encontrada no citosol, mostra geralmente diferença na regulação em relação às Prxs encontradas em cloroplastos como a Prx Q (HORLING et al., 2003).

Dentre todas as Prx, a Prx II-C parece ser a que apresenta o perfil de expressão mais peculiar e dessa forma, foi considerada como um indicador de desbalanço metabólico (HORLING et al., 2003). Nossos resultados com expressão protéica da Prx II-C (Figura 14) estão de acordo com os resultados obtidos por Horling et al.(2002), que mostrou também aumento na expressão de Prx II-C de folhas de *Arabidopsis thaliana* em resposta ao estresse salino.

Segundo Dietz et al (2006), os níveis de transcritos das Prx 2-Cis A e B e da Prx Q diminuem durante a senescência e em resposta a estresses bióticos e abióticos. Essa diminuição foi correlacionada com a perda de cloroplastos. No tocante aos resultados de detecção da quantidade relativa da proteína Prx Q, nas folhas das duas cultivares em resposta ao estresse salino (Figura 15), os mesmos foram

concordantes com os de folhas de *Arabidopsis* que também revelaram diminuição da expressão protéica (HORLING et al., 2002; DIETZ et al., 2006). Estudos de regulação de transcritos e de dados bioquímicos revelam que a Prx Q parece estar relacionada com a atividade fotossintética (DIETZ et al., 2006).

A Prx Q está associada com tilacóides e foi encontrada em frações de membranas enriquecidas em fotossistema II (PSII). A presença ou ausência da Prx Q nas referidas frações de *Arabidopsis thaliana*, afeta parâmetros de fluorescência da clorofila a, sugerindo papel protetor da mesma na fotossíntese. Apesar da diminuição da capacidade fotossintética bem como seu mecanismo, em resposta ao estresse salino, não serem ainda completamente elucidados, sugere-se que o PS II exerce papel chave na resposta às perturbações ambientais (BAKER, 1991). Convém salientar, que os resultados concernentes aos efeitos do estresse salino no PS II têm sido contraditórios em relação à atividade desse fotossistema. Masojidek e Hall (1992), Mishra; Subrahmanyam (1991), Belkhdja et al. (1994) e Everard et al. (1994) mostraram inibição da atividade do PSII, em resposta ao estresse salino, ao passo que Robinson et al. (1983), Brugnoli; Bjoerkman (1992); Morales et al. (1992); Abadia et al. (1999), mostraram que o estresse salino não afetou o referido fotossistema. Os níveis relativos da proteína D₁ do fotossistema II (PS-II) foram analisados em folhas de ambas as cultivares de *V. unguiculata*, em resposta ao estresse salino, através de Western blot (dados não mostrados). Os níveis de D₁ diminuíram em folhas de ambas as cultivares sob condição de estresse salino. Dessa forma, a diminuição dos níveis da proteína Prx Q de folhas de ambas as cultivares *Vigna unguiculata* em resposta ao estresse salino parece ser decorrente da diminuição da atividade fotossintética em consequência do estresse salino (CONGMING et al., 2003).

5. CONCLUSÃO

De acordo com os dados fisiológicos, bioquímicos e moleculares de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp analisados em resposta à salinidade, através de parâmetros de desenvolvimento como tamanho e peso fresco das diferentes partes das plantas, distribuição de íons Na^+ e K^+ , níveis de proteína da subunidade catalítica e da atividade enzimática da V-ATPase, a cultivar Pérola revelou-se menos tolerante que a Vita 3 ao estresse salino. As folhas foram o órgão mais vulnerável ao efeito da salinidade diante dos parâmetros avaliados e sendo o único que mostrou expressão protéica diferencial entre as cultivares. Dessa forma, esse órgão foi escolhido para estudo da expressão de transcritos das diferentes subunidades da V-ATPase, através de macroarranjo. No tocante à regulação da expressão de transcritos, observou-se regulação não coordenada entre as distintas subunidades da V-ATPase e entre as diferentes cultivares além de aumento temporal no teor de transcritos da subunidade catalítica (subunidade A) da cultivar mais tolerante ao estresse (Vita 3). A resposta tardia da expressão de transcritos e conseqüentemente da expressão de proteínas da V-ATPase, possivelmente foram fatores limitantes em relação a menor tolerância ao estresse salino em Pérola. Dessa forma, estudos bioquímicos e moleculares mostraram que a V-ATPase exerce papel crucial nos mecanismos de tolerância ao estresse salino, revelando maior atividade e expressão protéica (subunidade A) na cultivar Vita 3. Ademais, a abordagem do papel das enzimas antioxidantes (SOD, APX, Prx C-II e Prx Q) das plantas de *V. unguiculata* (L.) walp complementou o conhecimento do arsenal metabólico envolvido nos mecanismos de defesa aos efeitos deletérios do estresse salino, revelando que as enzimas SOD, APX e Prx-Q em folhas não foram efetivas na proteção contra o estresse oxidativo, gerado pela salinidade, ao passo que, a SOD em raízes e a Prx II-C em folhas da cv. Vita 3 parecem ter sido importantes. Portanto, o conhecimento fisiológico, bioquímico e molecular dos mecanismos de ajustamento aos efeitos de estresse é crucial não só para o conhecimento acadêmico, mas também para a escolha e modificação molecular futura de espécies vegetais que possam suportar condições ambientais adversas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIA A.; BELKOHODJA R.; MORALES F.; ABADIA J. Effects of salinity on the photosynthetic pigment composition of barley (*Hordeum vulgare* L.) growth under a triple-line-source sprinkler system in the field. **J. Plant Physiol** v.154, p. 392-400, 1999.

ALLEN G.J.; CHU S.P.; SCHUMACHER K.; SHIMAZAKI C.T.; VAFEADOS D.; KEMPER A.; HAWKE S.K.; TALLMAN G.; TSIEN R.Y.; HARPER J.F. Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. **Science** v. 289, p. 2338-2342, 2000.

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

ANDRADE JÚNIOR A.S.; SANTOS A.P.; SOBRINHOS C.A.; BASTOS E.A.; FREIRE FOLHO F.R.; et al. Embrapa Meio Norte. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/feijão/feijãocaupi/importância.html>>. Acesso em: 20 maio 2004.

APSE M.P.; AHARON G.S.; SNEDDEN W.A.; BLUMWALD E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. **Science** v. 285, p.1256-1258, 1999.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. **Physiol. Plant**. v. 85, p. 235–241, 1992.

ASADA, K.; TAKAHASHI M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis apud SHIGEOKA S.; ISHIKAWA T.; TAMOI M.; MIYAGAWA Y.; TAKEDA T.; YABUTA Y.; YOSHIMURA K. Regulation and function os ascorbate peroxidase isoenzymes. **J. Exp. Botany** 53: 1305-1319, 2002.

ASHAF M. Breeding for salinity tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant sciences** v. 13, p. 17-42, 1994.

BAEUERLE C.; HO M.N.; LINDORFER M.A.; TEVENS T.H. The *saccharomyces cerevisiae* VMA6 gene encodes the 36-kDa subunit of the vacuolar H⁺-ATPase membrane sector. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 12749-12757, 1993.

BAIER M.; DIETZ K.J. Protective function of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic *Arabidopsis*, **Plant Physiol**. V. 119, p. 1407–1414, 1999.

BAIER M.; DIETZ K.J. Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** v. 119, p.1407–1414, 1999.

BAIER M.; DIETZ K.J. The costs and benefits of oxygen in photosynthetic plant metabolism, **Prog. Bot.** v. 60, p. 283–314, 1998.

BAIER M.; DIETZ K.J. The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear encoded chloroplast protein. Its expressional regulation phylogenetic origin and implications for its specific physiological function in plants, **Plant J.** v. 12, p. 179–190, 1997.

BAIER M.; NOCTOR G.; FOYER C.H.; 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 Physiol.** v. 124, p. 823–832, 2000.

BAKARDJIEVA S.; BEZDICZA P.; GRYGAR T.; VORM P. Reductive dissolution of microparticulate manganese oxides. **J. Solid State Electrochem.** v. 4, p. 306-313, 2000.

BAKER N.R. Possible role of photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. **Physiol. Plant.** v. 81, p. 563- 570, 1991.

BALLESTEROS E.; BLUMWALD E.; DONAIRE J.P.; BELVER A. Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress. **Physiol. Plant.** v. 99, p. 328-334, 1997.

BARKLA B.J.; ZINGARELLI L.; BLUMWALD E.; SMITH J.A.C. Tonoplast Na⁺/H⁺ antiport activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Physiol** v. 109, p.549–556, 1995.

BARRETO P.D.; SANTOS A.A.; VIDAL J.C.; QUINDERÉ M.A.W.; SÁ M,F.P. Reação de genótipos de *Vigna unguiculata* à sarna e efeito da doença sobre componentes de produção. **Fitopatol. Bras.** v. 26, p. 1-7, 2001.

BELKHODJA R.; MORALES F.; ABADIA A.; GOMEZ-APARISI J.; ABADIA J. Chlorophyll fluorescence as a possible tool for salinity tolerance screening in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Physiol** v. 104, p. 667-673, 1994.

BEM-HAYYIM G.; KAFKAFI U.; GANMORE-NEUMANN R. Role of internal potassium in maintaining growth of cultured citrus cells on increasing NaCl and CaCl₂ concentrations. **Plant Physiology** v. 85, p. 434-439, 1987.

BHANDAL I.S.; MALIK C.P. Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. **International Review of Cytology** v. 110, p. 205-254, 1988.

BINZEL M.L. NaCl induced accumulation of tonoplast and plasma membrane H⁺-ATPase message in tomato. **Physiol Plant**. V. 94, p. 722-8, 1995.

BINZEL M.L.; RATAJCZAK R. Function of membrane transport systems under salinity, 2001 apud WANG B.S.; LÜTTGE U.; RATAJCZAK R. Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. **J Exp Bot**. v. 52, p. 2355-2365, 2001.

BLAHA G.; STELZL U.; SPAHN C.M.T.; AGRAWAL R.K.; FRANK J.; NIERHAUS K.H. Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. **Methods in Enzymology** v. 317, p. 292-309, 2000.

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

BLUMWALD E.; AHARON G.S.; APSE M.P. Sodium transport in plant cells. **Biochim Biophys Acta**. v. 1465, p.140-51, 2000.

BLUMWALD E.; POOLE R.J. Salt tolerance in suspension cultures of sugar beet. Induction of Na⁺/H⁺ antiport activity at the tonoplast by growth in salt. **Plant Physiol** v. 83, p. 884-887, 1987.

BOWLER, C. *ET AL.* Superoxide dismutases and stress tolerance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 43, p. 83-116, 1992.

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

BRAY E.A. Alterarions in gene expression in response to water deficit apud Stress induced gene expression in plants, Basra AS ed. (Chun, Switzerland: Harwood Academic Publishers), p. 1-23, 1994.

BROWN, T.A. Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução. Trad. Ferreira HB e Passaglia L M P. 4.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2003.

BRUGNOLI E.; BJOÈRKMAN O. Growth of cotton under continuous salinity stress: influence on allocation pattern, stomatal and non-stomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy. **Planta** v. 187, p. 335-345, 1992.

BUCHANAN B.B; GRUISSEM W.; JONES R.L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000, pp.1195.

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

CAVALCANTI F.R.; LIMA J.P.M.S; FERREIRA-SILVA S.L.; VIÉGAS R.A.; SILVEIRA J.A.G. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. **J. Plant Physiol** v. 2006.

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

CHAE H.Z.; UHM T.B.; RHEE S.G. Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 91, p. 7022–7026, 1994.

CHEN G.X.; ASADA K. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isoenzymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. **Plant and Cell Physiol** v. 30, p.987-998, 1989.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. **Anal. Biochem.** v. 162, p. 156–159, 1987.

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

CONGMING L.U.; QIU N.; WANG B.; ZHANG J. Salinity treatment shows no effects on photosystem II photochemistry, but increases the resistance of photosystem II to heat stress in halophyte *Suaeda salsa*. **J. Exp Bot**, v. 54, p. 851-860, 2003.

COSTA P.H.; SILVA J.V.; BEZERRA M.A.; ENÉAS FILHO J.; PRISCO J.T.; GOMES FILHO E. Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em cultivares de *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. **Revista Brasil. Bot.** v. 26, p. 289-297, 2003.

COUNILLON L.; POUSSEGUR J. The expanding family of eukaryotic Na⁺/H⁺ exchangers. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 1-4, 2000.

DARLEY C.P.; DAVIES J.M.; SANDERS D. Chill-induced changes in the activity and abundance of the vacuolar proton-pumping pyrophosphatase from mung bean hypocotyls. **Plant Physiol**. v. 109, p. 659-665, 1995.

DARLEY C.P.; WUYTSWINKEL O.C.M.; WOUDE K.; MAGER W.H.; BOER A.H. *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae* NHX1 genes encode amiloride sensitive electroneutral Na⁺/H⁺ exchangers. **Biochemical Journal** v. 351, p. 241-249, 2000.

DICHTL B.; STEVENS A.; TOLLERVEY D. Lithium toxicity in yeast is due to inhibition of RNA processing enzymes. **EMBO Journal** v. 16, p. 7184-7195, 1997.

DIETZ K.J.; HEBER U.; MIMURA T. Modulation of the vacuolar H⁺-ATPase by adenylates as basis for the transient CO₂-dependent acidification of the leaf vacuole upon illumination. **Biochim Biophys Acta** v. 1373 p. 87-92, 1998.

DIETZ K.J.; HORLING F.; KÖNIG J.; BAIER M. The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. **J Exp Bot** v. 53, p.1321-1329, 2002.

DIETZ K.J.; JACOB S.; OELZE M.L.; LAXA M.; TOGNETTI V.; DE MIRANDA S.M.N.; BAIER M.; FINKEMEIER I. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. **J. Exp. Bot.** v. 57, p. 1697-1709, 2006.

DIETZ K.J.; RUDLOFF S.; AGEORGES A.; ECKERSKORN C.; FISCHER K.; ARBINGER B. Subunit E of the vacuolar H⁺-ATPase of *Hordeum vulgare* L.: cDNA cloning, expression and immunological analysis. **Plant J** v. 8, p. 521-529, 1995.

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

DOMGALL I.; VENZKE D.; LÜTTGE U.; RATAJCZAK R.; BÖTTCHER B. Three dimensional map of a plant V-ATPase based on electron microscopy. **J Biol Chem.** v. 277, p. 13115-13121, 2002.

DUPONT F.M. Salt-induced changes in ion transport: regulation of primary pumps and secondary transporters. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v. 294, p. 341-346, 1992.

EMBRAPA MEIO NORTE. Caupi movimentada mais de US\$ 249 milhões no Brasil. **Embrapa Meio Norte**, v.3, p.4-5, 2001.

ELSTNER E.F. (1991) Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. Apud Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **J. Exp Bot** v. 53, p. 1331-1341, 2002.

EVERARD J.D.; GUCCI R.; KANN S.C.; FLORE J.A.; LOESCHER W.H. Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. **Plant Physiol** v. 106, p. 281-292, 1994.

FÉLIX J.M.; DRUMOND R.D.; NOGUEIRA E.T.S.; ROSA JÚNIOR V.E.; JORGE R.A.; ARRUDA P.; MENOSSI M. Uso de arranjos de DNA em náilon para a análise da expressão gênica em larga escala. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** v. 24, p. 60-67, 2002.

FENG Y.; FORGAC M. Inhibition of vacuolar H⁺-ATPase by disulfide bond formation between cysteine 254 and cysteine 532 in subunit A. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 13224-13230, 1994.

FERNANDES DE MELO D.; JOLIVET Y.; FAÇANHA A.R.; GOMES FILHO E.; SILVA LIMA M.; DIZENGREMEL P. Effect of salt stress on mitochondrial energy metabolism of *Vigna unguiculata* cultivars differing in NaCl tolerance. **Plant Physiol. Biochem.** v. 32, p. 405-412, 1994.

FERY RL. Development of improved southernpea varieties for the southern united states: an update on the usda effort. *Vegetable Association Yearbook*, p.53, 2002.

FINKEMEIER I.; GOODMAN M.; LAMKEMEYER P.; KANDLBINDER A.; SWEETLOVE L.J.; DIETZ K.J. The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of *Arabidopsis thaliana* under stress. **J. Biol. Chem.** v. 280, p. 12168–12180, 2005.

FISKE C.F.; SUBBAROW Y. The calorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.** v.66, p. 375- , 1925.

FLOWERS T.; HAJIBAGHERI M.A.; CLIMPSON N.J.W. Halophytes. **Quarterly Review of Biology** v. 61, p. 313-17, 1986.

FLOWERS T.J.; TROKE P.F.; YEO A.R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. **Annual Review of Plant Physiol** v. 28, p. 89-121, 1977.

FLOWERS T.J.; YEO A.R. Breeding for salt resistance in plants. Apud: Jaiwal PK, Singh RP, Gulati A. (Eds.), *Strategies for improving salt tolerance in higher plants*. Oxford and IBH, New Delphi, p. 247-264, 1997.

FOYER C.H.; NOCTOR G. Oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signalling, **New Phytol.** v. 146 p., 359–388, 2000.

FRIDOVICH, L. Superoxide dismutases. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology** v. 58, p. 61-97, 1986.

FUKUDA A.; CHIBA K.; MAEDA M.; NAKAMURA A.; MAESHIMA M.; TANAKA Y. Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H1-pyrophosphatase, H1-ATPase subunit A, and Na¹/H¹ antiport from barley. **J Exp Bot** v. 55, p. 585–594, 2004.

FUKUDA A.; YAZAKI Y.; ISHIKAWA T.; KOIKE S.; TANAKA Y. Na⁺/H⁺ antiporter in tonoplast vesicles from rice roots. **Plant and Cell Physiol** v. 39, p.196-201, 1998.

GABARINO J.; DUPON F.M. Rapid induction of Na⁺/H⁺ exchange activity in barley root tonoplast. **Plant Physiol** v.89, p. 1-4, 1988.

GALLEGO S.M.; BENAVIDES M.P.; TOMARO ML. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Sci.** v. 121, p.151-159, 1996.

GAXIOLA R.A.; RAO R.; SHERMAN A.; GRISAFI P.; ALPER S.L.; FINK G.R. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 96, p. 1480–1485, 1999.

GETZ H.P.; KLEIN M. Characteristics of sucrose transport and sucrose-induced H⁺ transport on the tonoplast of red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. **Plant Physiol.** v. 107, p. 459-467, 1995.

GLÄSER H.U.; THOMAS D.; GAXIOLA R.; MONTRICHARD F.; SURDINKERJAN Y.; SERRANO R. Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a putative phosphatase gene. **EMBO Journal** v. 12, p. 3105-3110, 1993.

GOLLDACK D.; DIETZ K.J. Salt-induced expression of the vacuolar H⁺-ATPase in the common ice plant is developmentally controlled and tissue specific. **Plant Physiol** v. 125, p. 1643–1654, 2001.

GRANT J.J.; LOAKE G.J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiol** v. 124, p. 21-29, 2000.

GREENWAY H.; MUNNS R. Mechanism of salt tolerance in non halophytes. **Ann. Rev. Plant Physiol.** v. 31, p.149-190, 1980.

GREENWAY H.; OSMOND C.B. Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. **Plant Physiol** v. 49, p. 256-259, 1972.

HASEGAWA P.M.; BRESSAN R.A.; ZHU J.K.; BOHNERT H. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 51, p. 463–499, 2000.

HERNANDEZ J.A.; DEL RIO A.L.; SEVILLA F. Salt stress induced changes in superoxide dismutase isozymes in leaves and mesophyll protoplasts from *Vigna radiata* (L.) Walp. **New Phytol.** v. 126, p. 37-44, 1994.

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

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

HORIE T.; SCHROEDER J.I. Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. **Plant Physiol** v. 136, p. 2457-2462, 2004.

HORLING F.; KÖNIG J.; DIETZ K.J. Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins. **Plant Physiol Biochem** v. 40, p. 491-499, 2002.

HORLING F.; LAMKEMEYER P.; KÖNIG J.; FINKEMEIER I.; BAIER M.; KANDBINDER A.; DIETZ K.J. Divergent light-, ascorbate- and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol** v. 131, p. 317-325, 2003.

INGRAM J.; BATELS D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiol Plant Mol Bio.** v. 47, p. 377-403, 1996.

JACOBSEN T.; ADAMS R. Salt and silt in Mesopotamian agriculture. **Science** v.128 p.1251-1258, 1958.

JIMÉNEZ A.; HERNÁNDEZ J.A.; DEL RIO L.A.; SEVILLA F. Evidence for the presence of the ascorbate-gluthatione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiol** v. 114, p. 275-284, 1997.

KANEMATSU S.; ASADA K. Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. **Plant Cell Physiol** v. 31, p. 99-112, 1990.

KAWAMURA Y.; ARAKAWA K.; MAESHIMA M.; YOSHIDA Y. Tissue specificity of E subunit isoforms of plant vacuolar H⁺-ATPase and existence of isotype enzymes. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 6515-6522, 2000.

KLINK R.; LÜTTGE U. Electron-microscopic demonstration of a head and stalk structure of the leaf vacuolar ATPase in *Mesembryanthemum crystallinum* L. **Bot. Acta** v. 104, p. 122-131, 1991.

KLINK R.; HASCHKE H.P.; KRAMER D.; LÜTTGE U. Membrane-particles, proteins and ATPase activity of tonoplast vesicles of *Mesembryanthemum crystallinum* L. in C-3 and CAM state. **Bot. Acta** v. 103, p. 24-31, 1990.

KLUGE C.; GOLLDACK D.; DIETZ K.J. Subunit D of the vacuolar H⁺-ATPase of *Arabidopsis thaliana*. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1419, p. 105-110, 1999.

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

LEE TAIZ S.; TAIZ L. Ultrastructural comparison of the vacuolar and mitochondrial H⁺-ATPases of *Daucus carota*. **Bot. Acta** v. 104, p. 121-131, 1991.

LEONARDIS S.D.; DIPIERRO N.; DIPIERRO S. Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. **Plant Physiol Biochem** v. 38, p. 773-779, 2000.

LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA, 1999-2001 apud ANDRADE JÚNIOR et al. Embrapa Meio Norte. Disponível em: <<http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/feijão/feijãocaupi/importância.html>>. Acesso em: 20 maio 2004.

LI X.; SZE H. A 100 kDa polypeptide associates with the Vo membrane sector but not with the active oat vacuolar H⁺-ATPase, suggesting a role in assembly. **Plant J.** v. 17, p. 19-30, 1999.

LI Z.; ZHANG X. Electron-microscopic structure of the V-ATPase from mung bean. **Planta** v. 219, p. 948-954, 2004.

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

LÖW R.; RAUSCH T. In suspension-cultured *Daucus carota* cells salt stress stimulates H⁺-transport but not ATP hydrolysis of the V-ATPase. **J. Exp. Bot** v. 47, p. 1725-1732, 1996.

LÖW R.; ROCKEL B.; KIRSCH M.; RATAJCZAK R.; HÖRTENSTEINER S.; MARTINOIA E.; LÜTTGE U.; RAUSCH T. Early salt stress effects on the differential expression of vacuolar H⁺-ATPase genes in roots and leaves of *Mesembriathemum crystallinum*. **Plant Physiol** v. 110, p. 259-265, 1996.

LUDWIG J.; KERSCHER S.; BRANDT U.; PFEIFFER K.; GETLAWI F.; APPS D.K.; SCHAGGER H. Identification and characterization of a novel 9.2 kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton ATPase from chromaffin granules. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 10939-10947, 1998.

LÜTTGE U.; FISCHER-SCHLIEBS E.; RATAJCZAK R. The H⁺-pumping V-ATPase of higher plants: a versatile "eco-enzyme" in response to environmental stress. **Cell. Biol. Mol. Lett.** v. 6, p. 356-361, 2001.

LÜTTGE, U. & RATAJCZAK, R. (1997) apud *The Plant Vacuole*, eds. LEIGH, R. A.; MAESHIMA, M. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1465, p. 37-51, 2000.

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

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

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

MARTY F. Cytochemical studies on GERL, provacuoles and vacuoles in root meristematic cells of *Euphorbia*. **Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.** v. 75, p. 852-856, 1978.

MARTY, F. Plant vacuoles. **Plant Cell** v. 11, p. 587–599, 1999.

MASOJIDEK J.; HALL D.O. Salinity and drought stresses are amplified by high irradiance in sorghum. **Photosynthetica** 27, 159-171, 1992.

MATSUOKA K. C-Terminal propeptides and vacuolar sorting by BP-80-type protein: not all C-terminal propeptides are equal. **Plant Cell** v. 12, p. 181-182, 2000

MATSUURA-ENDO C.; MAESHIMA M.; YOSHIDA S. Subunit composition of vacuolar membrane H⁺-ATPase from mung bean. **Eur. J. Biochem.** v. 187, p. 745-751, 1990.

MCCUE T.; HANSON M. apud SERRANO R.; MULET J.M.; RIOS G.; MARQUEZ J.A.; LARRYNOA I.F.; LEUTE M.P.; MENDIZABAL I.; PASCUAL-AHUIR A.; PROFT M.; ROS R.; MONTESINOS C. A glimpse of mechanisms of ion homeostasis during salt stress. **J. Exp Bot** 50: 1023-1036, 1999.

MICKLOS D. A.; FREYER G.A.; CROTTY D.A. A ciência do DNA. Porto Alegre: Artmed, 2005.

MIMURA T.; KURA-HOTTA M.; TSUJIMURA T.; OHNISHI M.; OKAZAKI Y.; MIMURA M.; MAESHIMA M.; WASHITANI-NEMOTO S. Rapid increase of vacuolar volume in response to salt stress. **Planta** v. 216, p. 397–402, 2003.

MISHRA S.K.; SUBRAHMANYAM D.; SINGHAL G.S. Interactionship between salt and light stress on the primary process of photosynthesis. **J. Plant Physiol** 138, 92-96, 1991.

MITTLER M.; ZILINSKAS P. Molecular characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. **J. Biol Chem** v. 267, p. 21802-21807, 1992.

MORALES F.; ABADIA A.; GOMEZ-APARIS J.; ABADIA J. Effects of combined NaCl and CaCl₂ salinity on photosynthetic parameters of barley grown in nutrient solution. **Physiol Plant.** 86, 419-426, 1992.

MORRÉ D.J.; LIEDTKE C.; BRIGHTMAN A.O.; SCHERER G.F.E. Head and stalk structures of soybean vacuolar membranes. **Planta** v. 184, p. 343-349, 1991.