



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

CARLOS EDUARDO BRAGA DE ABREU

**ANÁLISE FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA DE RESPOSTAS AO
ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE FEIJÃO DE CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**

FORTALEZA - CE

2012

CARLOS EDUARDO BRAGA DE ABREU

ANÁLISE FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA DE RESPOSTAS AO ESTRESSE
SALINO EM PLANTAS DE 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 a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

FORTALEZA - CE

2012

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

-
- A145a Abreu, Carlos Eduardo Braga de.
Análise fisiológica, bioquímica e proteômica de respostas ao estresse Salino em plantas de feijão de corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] / Carlos Eduardo Braga de Abreu. – 2012.
151 f. : il., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Dr. Enéas Gomes Filho.
1. Espectrometria de massas. 2. Padrão de proteínas. 3. Salinidade. I. Título.

CDD 574-192

CARLOS EDUARDO BRAGA DE ABREU

ANÁLISE FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA DE RESPOSTAS AO ESTRESSE
SALINO EM PLANTAS DE FEIJÃO DE CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Bioquímica como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, área de concentração Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra a disposição dos interessados na Biblioteca desta Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que feita de acordo com as normas da ética científica.

Aprovada em 28/09/2012

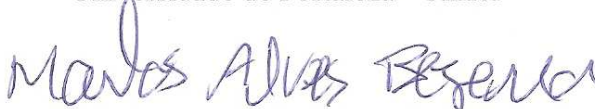
BANCA EXAMINADORA



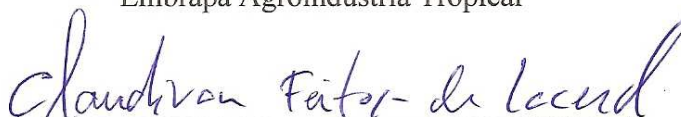
Prof. Dr. Enéas Gomes Filho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC



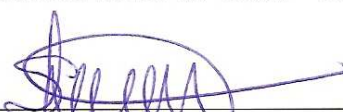
Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Universidade de Fortaleza - Unifor



Dr. Marlos Alves Bezerra
Embrapa Agroindústria Tropical



Prof. Dr. Claudivan Feitosa de Lacerda
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. Sérgio Luiz Ferreira Da Silva
Universidade Federal do Ceará - UFC

“O homem ainda traz em sua estrutura física a marca indelével de sua origem primitiva”.

Charles Darwin

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Professor Dr. Enéas Gomes Filho, pela confiança, amizade, apoio e orientação durante toda a minha vida acadêmica. Obrigado pelos valiosos conselhos e pelo tempo dedicado a mim.

Ao professor Dr. José Tarquinio Prisco, pela co-orientação e disponibilidade para contribuir com minha formação acadêmica e com meu projeto de Tese. Por sempre estar disponível para aconselhar, orientar e contribuir com meu trabalho.

Aos professores Dr. Claudivan Feitosa de Lacerda e Dr. Sérgio Luiz Ferreira Da Silva, pela participação na banca examinadora e valiosas sugestões para a melhoria desse trabalho.

Ao Dr. Marlos Alves Bezerra, sou grato pela sua participação na banca examinadora e valiosas sugestões para a melhoria desse trabalho.

À Universidade de Fortaleza (Unifor), na pessoa da professora Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira, pela grande colaboração para o desenvolvimento desse trabalho e pela disponibilidade em participar da banca examinadora desta tese.

Ao Dr. Frederico Moreno, da Unifor, pela valiosa contribuição nas análises de espectrometria de massas que permitiram a conclusão deste trabalho. Aproveito para agradecer à Marina Lobo, aluna de doutorado em bioquímica desta Universidade, pela disponibilidade e ajuda nessa parte da pesquisa.

Ao professor Dr. Hélio Costa, da UFC, pela inestimável colaboração na identificação das proteínas, por sua dedicação e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal I e II: Alexcyane Feijão, Cibelle Gadelha, Daniel Farias, Elaine Angelim, Elton Marques, Franklin Aragão, Michella de Albuquerque, Thiago Augusto, Nara Lídia, Paulo André, Rafael Miranda, Jones Vidal, Vitor Freitas, Ian Valença, Viviane Pinho e Valdinéia Soares pela amizade e por todos os momentos maravilhosos de convivência que pude vivenciar com vocês.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTsal/CNPq).

RESUMO

ABREU, C. E. B. **Análise fisiológica, bioquímica e proteômica de respostas ao estresse salino em plantas de feijão de corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**. Fortaleza: UFC. 151 f. (Tese).

No presente trabalho foi realizado um estudo integrado de fisiologia, bioquímica e proteômica comparativa em feijão de corda, uma cultura de grande valor econômico, com o objetivo de entender respostas de aclimação das plantas à salinidade. Para tanto, dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sob condições hidropônicas, utilizando dois cultivares de feijão de corda (*Vigna unguiculata*) com tolerância diferencial ao estresse salino: Pitiúba (tolerante) e TVu 2331 (sensível). No primeiro experimento foram avaliadas as mudanças fisiológicas (crescimento, trocas gasosas, teor relativo de água, teor de clorofila, fluorescência da clorofila) e bioquímicas (acúmulo de íons e solutos orgânicos em folhas e raízes e padrão de expressão protéico foliar) induzidas por concentrações crescentes de salinidade (NaCl a 50, 75 e 100 mM). Os resultados demonstraram a existência de respostas contrastantes entre os cultivares estudados, especialmente com relação à inibição do crescimento da parte aérea e ao acúmulo de solutos compatíveis, os quais foram maiores no TVu. Contudo, a salinidade não alterou os parâmetros de fluorescência da clorofila em ambos os cultivares. Concentrações crescentes de NaCl alteraram de forma diferencial o padrão de expressão de proteínas nas folhas, com maiores alterações na dose 100 mM de NaCl. Apesar disso, no segundo experimento, a concentração moderada de sal com NaCl a 75 mM foi escolhida como referência para o estudo das mudanças no proteoma durante o estresse salino e após um período pós-estresse (recuperação). A salinidade modificou a expressão de 22 “spots” protéicos no Pitiúba, dos quais 10 (6 que aumentaram e 4 que diminuíram) tiveram suas identidades determinadas por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (LC-ESI-MS/MS). No TVu foram observadas mudanças em 27 “spots”, sendo determinada a identidade de 9 (5 que aumentaram e 4 que diminuíram). Além destes, 5 “spots” que mantiveram suas taxas de expressões em condições de salinidade no Pitiúba também foram identificados. A maioria das proteínas identificadas está relacionada com o processo de fotossíntese, realizando funções enzimáticas ou participando da constituição molecular dos fotossistemas. Proteínas com papel protetor contra o estresse, como chaperonas e enzimas do estresse oxidativo (SOD) foram identificadas, assim como a calreticulina, que provavelmente está envolvida em processos de transdução de sinal. Em adição, foi possível observar que durante a recuperação das plantas os mecanismos de homeostase às novas condições restabeleceram os níveis de algumas proteínas, o que sugere a participação delas no processo de aclimação ao estresse salino. No geral, os resultados fornecem informações adicionais que podem levar a uma melhor compreensão das bases moleculares da tolerância ou sensibilidade de plantas de feijão de corda à salinidade.

Palavras-chave: Espectrometria de massas, feijão de corda, padrão de proteínas, salinidade, recuperação

ABSTRACT

ABREU, C. E. B. **Physiologic, biochemistry and proteomic analysis of responses to salt stress in plants of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]**. Fortaleza: UFC. 151 f. (Tese).

In the present work, an integrated physiological, biochemical and proteomic analysis on cowpea (an economically important species) was carried out in order to understand the responses of plants to salinity. Two experiments were conducted in a greenhouse under hydroponic conditions, using two cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) with differential tolerance to salt stress: Pitiuba (tolerant) and TVu 2331 (sensitive). In the first experiment, we evaluated the physiological (growth, gas exchange, relative water content, chlorophyll content, chlorophyll fluorescence) and biochemical (ions and organic solutes accumulations) changes induced by increasing levels of salinity (50, 75 and 100 mM NaCl), as well as the influences of stress two-dimensional (2D) protein patterns in leaves tissues. The results showed the existence of contrasting responses between the cultivars studied, especially with respect to inhibition of shoot growth and the accumulation of compatible solutes, which were higher in TVu. However, salinity did not alter the fluorescence parameters in both genotypes. The global analysis of 2D protein patterns showed that increasing levels of NaCl differentially alter the expression pattern of proteins in leaves, with larger changes in dose 100 mM NaCl. Nevertheless, in the second experiment, the moderate dose of salt with 75 mM NaCl was chosen as the reference dose for the study of changes in the proteome during salt stress and recovery. Salinity altered the expression of 22 protein spots in Pitiuba. Of these spots, the identities of 10 (6 up-regulated and 4 down-regulated) were determined by liquid chromatography electro-spray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). In TVU changes were observed in 27 spots being the identity determined for 9 (5 up-regulated and 4 down-regulated). Besides these, 5 spots that kept their rates expressions in salinity conditions in Pitiuba were also identified. The majority of the identified proteins is related to the process of photosynthesis, performing enzymatic functions or participating in the molecular constitution of photosystems. Proteins with protective role against stress such as chaperones and enzymes of oxidative stress (SOD) were identified, as well as calreticulin, which are probably involved in signal transduction network. In addition, during recovery treatments homeostasis mechanisms of plants to new conditions restored the levels of certain proteins, suggesting their participation in the process of acclimation to salt stress. Overall, results provide some additional information that can lead to a better understanding of the molecular basis of salt tolerance or sensitivity in cowpea plants.

Keywords: Mass spectrometry, cowpea, protein pattern, salinity, recovery

LISTA DE FIGURAS

EXPERIMENTO 1	Página
Figura 1. Área foliar, matérias secas da parte aérea, das raízes e relação MSR/MSPA de plantas de feijão de corda, cultivares Pitiúba e TVu, submetidas a níveis crescentes de salinidade (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM).	72
Figura 2. Teor relativo de água em folhas de plantas de feijão de corda, cultivares Pitiúba e TVu, submetidos a níveis crescentes de salinidade (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM).	75
Figura 3. Teores clorofila, medidos com o medidor portátil SPAD-502, em plantas de feijão de corda cultivares Pitiúba e TVu, submetidos a níveis crescentes de salinidade (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM).	76
Figura 4. Eficiência potencial do fotossistema 2 (Fv/Fm), eficiência efetiva do fotossistema 2 (Φ PSII), “quenching” fotoquímico (qP) e “quenching” não-fotoquímico (NPQ) de plantas de feijão de corda, cultivares Pitiúba e TVu, submetidas a níveis crescentes de salinidade (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM).	78
Figura 5. Fotossíntese líquida, condutância estomática, taxa de transpiração e relação entre a concentração de CO ₂ interna e externa (C _i /C _e) de plantas de feijão de corda, cultivar Pitiúba e TVu, submetidas a níveis crescentes de salinidade (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM).	80
Figura 6. Teores de sódio e cloreto em folhas e raízes de plantas de feijão de corda, cultivares Pitiúba e TVu, submetidos a níveis crescentes de salinidade (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM).	82
Figura 7. Teores de potássio e relação Na ⁺ /K ⁺ em folhas e raízes de plantas de feijão de corda, cultivar Pitiúba e cultivar TVu, submetidas a níveis crescentes de salinidade (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM).	84
Figura 8. Teores de carboidratos, N-aminossolúveis e prolina livre em folhas e raízes de plantas de feijão de corda, cultivares Pitiúba e TVu, submetidas a níveis crescentes de salinidade (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM).	86
Figura 9. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de feijão de corda, cultivar Pitiúba, sob condições controle ou de estresse salino com NaCl a 50, 75 e 100 mM.	89
Figura 10. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de feijão de corda, cultivar TVu, sob condições controle ou de estresse salino com NaCl a 50, 75 e 100 mM.	90
EXPERIMENTO 2	
Figura 1. Área foliar, matérias secas da parte aérea, das raízes e relação MSR/MSPA de plantas de feijão de corda, cultivares Pitiúba e TVu, sob condições controle, de estresse salino (NaCl a 75 mM) e após 5 dias de recuperação na ausência de sal.	113
Figura 2. Teor relativo de água e potencial osmótico foliares de plantas de feijão de corda, cultivares Pitiúba e TVu, sob condições controle, de estresse salino (NaCl a 75 mM) e após 5 dias de recuperação na ausência de sal.	116
Figura 3. Géis eletroforéticos 2D mostrando os “spots” diferencialmente expressos (fator de variação > 2 vezes) em folhas de plantas de feijão de corda, cultivar Pitiúba, sob condições controle, de estresse salino com NaCl a 75 mM e após 5 dias de recuperação na ausência de sal.	118

Figura 4. Detalhes dos “spots” marcados na figura 3 que foram diferencialmente expressos (fator de variação > 2 vezes) no cultivar Pitiúba sob condições controle, de estresse salino com NaCl a 75 mM e após 5 dias de recuperação na ausência de sal. 119

Figura 5. Géis eletroforéticos 2D mostrando os “spots” diferencialmente expressos (fator de variação > 2 vezes) em folhas de plantas de feijão de corda, cultivar TVu, sob condições controle, de estresse salino com NaCl a 75 mM e após 5 dias de recuperação na ausência de sal. 121

Figura 6. Detalhes dos “spots” marcados na figura 5 que foram diferencialmente expressos (fator de variação > 2 vezes) no cultivar TVu sob condições controle, de estresse salino com NaCl a 75 mM e após 5 dias de recuperação na ausência de sal. 122

Figura 7. Alinhamento de sequências de aminoácidos da proteína peptidil prolil cis-trans isomerase (PPIase) feita com o ClustalW2. A sequência deduzida de *Vigna unguiculata* (VuESTsCont) é comparada com aquelas de *Glycine max* (acesso: XM_003556535) e de *Medicago truncatula* (acesso: gb|AFK36387.1). Resumo do alinhamento mostrando os valores de identidade entre as sequências analisadas. 136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas identificadas de folhas de plantas de feijão de corda sob estresse salino (NaCl a 75 mM) e após o período de recuperação.	125
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA - Ácido abscísico

AF - Área foliar

ATP - Adenosina trifosfato

CDKs - *Cyclin-dependent kinases*

CDPK - *Calcium-dependent protein kinase*

CEO - Complexo de evolução do oxigênio

CHAPS - Detergente Zwitteriônico

Ci/Ce - Relação entre a concentração interna e externa de CO₂

ClustalW2 - Programa de alinhamento de sequências

DNA *microarray* - Microarranjo de moléculas de DNA

dS/m - Decisiemens por metro, unidade de condutividade elétrica

DTT - Ditioneitol

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EROs - Espécies reativas de oxigênio

EST - *Expressed sequence tags*

Fv/Fm - Relação entre a fluorescência variável e a máxima

HSP - *Heat shock protein*

IPG buffer - Tampão concentrado com anfólitos

LC-ESI-MS/MS - Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray acoplada a cromatografia líquida

LEA - *Late embryogenesis abundant*

MAPKs - *Mitogen-activated protein kinases*

MASCOT - Programa de busca

MF - Massa fresca

Mowse Score - Probabilidade estatística de identificação da proteína predita

MM - Massa molecular

MS - Massa seca

MS/MS - Espectrometria de massas em tandem

MSPA - Matéria seca da parte aérea

MSR - Matéria seca da raiz

MSR/MSPA - Relação entre as matérias secas da raiz e da parte aérea

MT - Massa túrgida

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NPQ - Coeficiente de extinção não-fotoquímico

PEG - Polietilenoglicol

PEP carboxilase - Fosfoenolpiruvato carboxilase

pI - Ponto isoelétrico

PMF - *Peptide mass fingerprint*

PMSF - Fenilmetilsulfonilfluoreto

PPIase - Peptidil prolil isomerase

PS2 - Fotossistema 2

Φ **PSII** - Eficiência fotoquímica efetiva do fotossistema 2

PVPP - Polivinilpolipirrolidona

Q - Analisador de massas do tipo quadrupolo

qP - Coeficiente de extinção fotoquímico

Ru5PK - Ribulose 5-fosfato quinase

Rubisco - Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SPAD 502 - Medidor portátil de clorofila

TCA - Ácido tricloroacético

TOF - Analisador de massas por tempo de voo

TRA - Teor relativo de água

VICs - *Voltage independent channels*

Ψ_s - Potencial osmótico foliar

SUMÁRIO

	Pág.
Resumo	5
Abstract	6
Lista de figuras	7
Lista de tabelas	9
Lista de abreviaturas	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. OBJETIVOS	18
3.1- Geral	18
3.2- Específicos	18
3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	19
4. REVISÃO DE LITERATURA	20
4.1- Aspectos gerais do estresse salino em plantas	20
4.2- Parâmetros fotossintéticos e o estresse salino	22
4.3- Respostas das plantas à salinidade	25
4.4- Homeostases osmóticas e iônicas de plantas sob estresse salino	29
4.5- Expressão gênica versus estresse salino: mecanismos de tolerância	35
4.6- Proteômica de plantas sob estresse salino	38
4.7- Origem e importância do feijão de corda	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
EXPERIMENTO 1	
1. INTRODUÇÃO	61
2. MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1- Material vegetal e condições experimentais	62
2.2- Coleta das plantas e medidas de crescimento.....	63
2.3- Determinação do teor relativo de água	64
2.4- Teor relativo de clorofila, medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila	64
2.5- Determinação dos teores de solutos inorgânicos	65

2.5.1. Obtenção dos extratos	65
2.5.2. Teores de sódio, potássio e cloreto	65
2.6- Determinação dos teores de solutos orgânicos	66
2.6.1. Obtenção dos extratos	66
2.6.2. Carboidratos solúveis	66
2.6.3. N-aminossolúveis	66
2.6.4. Prolina livre	67
2.7- Padrões eletroforéticos bidimensionais	68
2.7.1. Extração das proteínas totais	68
2.7.2. Dosagem de proteínas	68
2.7.3. Eletroforese bidimensional e revelação dos spots	69
2.7.4. Análise das imagens	70
2.8- Delineamento experimental	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.1- Crescimento das plantas	71
3.2- Teor relativo de água	74
3.3- Teor relativo de clorofila	74
3.4- Fluorescência da clorofila	77
3.5- Trocas gasosas	79
3.6- Teores de sódio, potássio, cloreto e relação Na^+/K^+	81
3.7- Teores de solutos orgânicos	85
3.7.1. Carboidratos solúveis	85
3.7.2. N-aminossolúveis	85
3.7.3. Prolina livre	87
3.8- Padrões protéicos bidimensionais	88
4. CONCLUSÕES	92
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

EXPERIMENTO 2

1. INTRODUÇÃO	102
2. MATERIAL E MÉTODOS	104
2.1- Condições de cultivo das plantas	104
2.2- Coleta e crescimento das plantas	105

2.3- Relações hídricas	106
2.4- Análise proteômica	106
2.4.1. Extração das proteínas totais	106
2.4.2. Dosagem de proteínas	107
2.4.3. Eletroforese bidimensional e revelação dos spots	107
2.4.4. Análise das imagens	109
2.4.5. Digestão trípica “in-gel”	110
2.4.6. Espectrometria de massas e identificação das proteínas	111
2.5- Delineamento experimental e análise estatística	112
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
3.1- Crescimento vegetativo	112
3.2- Relações hídricas das plantas	115
3.3- Perfil eletroforético 2D durante o estresse salino e após recuperação	115
3.4- Proteínas identificadas	124
3.5- Proteínas com expressão diferenciada no cultivar Pitiúba	132
3.6- Proteínas com expressão diferenciada no cultivar TVu	135
4. CONCLUSÕES	141
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
6. CONCLUSÕES GERAIS	150

1. INTRODUÇÃO GERAL

A salinidade representa um dos mais sérios problemas ambientais que afeta a produtividade agrícola mundialmente. Aproximadamente 6% das terras em todo o mundo e 23% das terras cultivadas vêm enfrentando problemas de salinização (FAO, 2005). Entretanto, uma significativa proporção de terras agrícolas tem se tornado salina devido à elevação das temperaturas climáticas e ao uso da irrigação (SZABOLCS, 1994). O impacto dos sais sobre o potencial osmótico dos solos reduz a absorção de água pelas raízes e altera, subsequentemente, o balanço hídrico da planta. Em adição, a absorção excessiva de íons tóxicos (principalmente Na^+ e Cl^-) pode causar distúrbios fisiológicos e nutricionais dentro da planta (MUNNS, 2002; ZHU, 2001a).

As culturas agrícolas, em sua maioria, não são tolerantes a altos níveis de salinidade, de modo que as mais sensíveis são drasticamente afetadas pelos efeitos deletérios dos sais. O feijão de corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], uma das mais importantes leguminosas cultivadas em regiões de clima semi-árido, é uma cultura de grande importância para a região Nordeste do Brasil, sendo cultivada pela maioria dos pequenos e médios produtores (ARAÚJO; WATT, 1988; EHLERS; HALL, 1997). Nessa região, a espécie é também caracterizada por ser uma excelente fonte de carboidratos, lipídios, minerais, vitaminas e, principalmente, proteínas para as populações de baixa renda (PHILLIPS *et al.*, 2003). Comparado às outras espécies cultivadas, o feijão de corda tem sido classificado como uma espécie moderadamente tolerante à salinidade (AYERS; WESTCOT, 1999). Entretanto, seu grau de tolerância ao estresse salino pode variar dependendo de aspectos como o cultivar, o estágio de desenvolvimento da planta, o tipo de sal e a forma de imposição do estresse.

Vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de se entender as respostas do feijão de corda ao estresse salino (MURILLO-AMADOR *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2003;

SILVEIRA *et al.*, 2001). No entanto, a maioria das pesquisas permanece nos campos fisiológicos e bioquímicos, existindo pouca informação sobre os processos moleculares básicos envolvidos na tolerância dessa cultura à salinidade. Atualmente, processos como a fotossíntese, o metabolismo do nitrogênio, a homeostase iônica, bem como a atividade de enzimas em vias metabólicas afetadas pela salinidade têm sido extensivamente estudados (CAVALCANTI *et al.*, 2007). As respostas das plantas aos sais, no entanto, é um fenômeno complexo e de difícil entendimento por resultar de modificações na expressão de vários tipos de genes (HASEGAWA *et al.*, 2000). Estes, por sua vez, estão associados com diversos processos fisiológicos e bioquímicos, bem como com alterações morfológicas e desenvolvimentais da planta (GREENWAY; MUNNS, 1980). Portanto, estudos relacionados com a fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas, apesar de relevantes, podem não ser suficientes para revelar a complexidade dos mecanismos de tolerância à salinidade.

A abordagem proteômica tem se mostrado uma poderosa ferramenta para estudar os mecanismos de tolerância das plantas a estresses ambientais, tais como o salino (SHA VALLI KHAN *et al.*, 2007; VINCENT *et al.*, 2007). Por meio dessa abordagem, o perfil global de expressão de proteínas tem sido investigado utilizando-se de técnicas de eletroforese bidimensional (2D) combinadas com espectrometria de massas (WESTERMEIER; LOYLAND; ASBURY, 2002). Assim, mudanças específicas no perfil de proteínas, cujas funções biológicas estão relacionadas com a tolerância ao estresse salino, foram observadas em muitas espécies de plantas: trigo (*Triticum durum*; CARUSO *et al.*, 2008), videira (*Vitis vinifera*; JELLOULI *et al.*, 2008), gergelim (*Sesamum indicum*; GEHLOT; PUROHIT; SHEKHAWAT, 2005) e arroz (*Oryza sativa*; SALEKDEH *et al.*, 2002).

Além disso, a análise proteômica oferece a possibilidade de identificação e caracterização funcional das proteínas diferencialmente expressas pela salinidade. Recentemente, Askari *et al.* (2006), realizando um estudo proteômico dos efeitos do NaCl em

folhas da halófito *Suaeda aegyptiaca*, identificaram 27 proteínas envolvidas em diversos processos metabólicos (p. ex. tolerância ao estresse oxidativo, síntese de glicina betaína, fotossíntese, degradação de proteínas, produção de ATP e destoxificação de cianeto), sendo seus possíveis papéis na tolerância de *S. aegyptiaca* ao estresse salino discutidos pelos autores. Estudos neste sentido também foram realizados para investigar as diferenças no nível de proteínas de folhas (OUERGHI *et al.*, 2000) e raízes (MAJOUUL *et al.*, 2000) entre variedades de trigo com tolerância diferencial à salinidade. Portanto, há muito interesse em identificar e entender o padrão de expressão de proteínas em plantas submetidas à salinidade.

O presente trabalho visou à obtenção de informações sobre as mudanças no perfil de proteínas de plantas de feijão de corda (*V. unguiculata*) devido ao estresse salino. Baseando-se em uma abordagem proteômica comparativa entre cultivares com tolerância diferencial à salinidade, pretendeu-se identificar e caracterizar as proteínas envolvidas com a tolerância ao sal. Tais conhecimentos serão de extrema valia para o entendimento dos mecanismos moleculares que governam as respostas à salinidade, os quais poderão fornecer uma importante contribuição para o desenvolvimento (por transformação genética) ou seleção de plantas melhor adaptadas a tais condições.

2. OBJETIVOS

2.1- Geral

Analisar os efeitos do estresse salino (NaCl) no proteoma de dois cultivares de feijão de corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] com tolerância diferencial à salinidade, buscando a identificação e caracterização de “proteínas marcadoras” que possam estar relacionadas com as respostas fisiológicas e bioquímicas dessa espécie a tais condições.

2.2- Específicos

- Caracterizar os seguintes parâmetros fisiológicos: crescimento, teor relativo de água, potencial osmótico foliar, fotossíntese, transpiração, condutância estomática, concentração interna de CO₂, teor relativo de clorofila e fluorescência da clorofila;
- Realizar análises bioquímicas comparativas dos teores de solutos orgânicos (carboidratos, N-aminossolúveis e prolina) e inorgânicos (Na⁺, K⁺ e Cl⁻) em dois cultivares de feijão de corda com tolerância diferencial à salinidade;
- Elaborar mapas proteômicos reprodutíveis e de alta qualidade para tecidos foliares, avaliando as alterações nos padrões protéicos bidimensionais em concentrações crescentes de salinidade;
- Analisar, identificar e comparar as proteínas diferencialmente expressas nos tecidos foliares das plantas durante e após o tempo de exposição ao estresse com NaCl;
- Classificar funcionalmente as proteínas identificadas e discutir a importância delas para os processos de aclimação/adaptação das plantas à salinidade.

3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Com o intuito de alcançar os objetivos propostos, realizou-se um estudo integrado da fisiologia, bioquímica e proteômica comparativa entre cultivares de feijão de corda com tolerância diferencial à salinidade: Pitiúba (tolerante) e TVu 2331 (sensível). Para isto, técnicas de eletroforese bidimensional (2D) e de espectrometria de massas foram empregadas e os resultados obtidos analisados em programas de bioinformática.

Em um primeiro experimento as plantas foram submetidas a concentrações crescentes de salinidade (NaCl a 50, 75 e 100 mM), sendo determinadas as principais mudanças fisiológicas e bioquímicas sob condições de estresse. Em adição, as alterações nos padrões de expressão das proteínas dos tecidos foliares devido ao aumento da salinidade no meio de crescimento foram avaliadas. Com base nos resultados obtidos, um segundo experimento foi executado com o intuito de monitorar as mudanças no proteoma de folhas de plantas de feijão de corda submetidas ao NaCl e durante um período pós-estresse. Neste experimento, as proteínas com níveis de expressão alterados por mais de duas vezes foram selecionadas para identificação por espectrometria de massas. Então, a partir dos dados proteômicos, os mecanismos moleculares de resposta ao estresse salino nos cultivares de feijão de corda foram discutidos.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1- Aspectos gerais do estresse salino em plantas

Dentre os estresses abióticos que mais afeta a produção e a distribuição geográfica de importantes culturas, destaca-se a salinidade, uma condição do solo caracterizada por altas concentrações de sais solúveis. Os solos salinos, caracterizados por possuírem condutividade elétrica do extrato de saturação igual ou superior a 4 dS/m (USDA-ARS, 2008), equivalente a 40 mM de NaCl, inibem o crescimento das plantas por duas razões principais. Inicialmente, a alta concentração de sais (principalmente dos íons Na^+ e Cl^-) no ambiente radicular reduz o potencial osmótico da solução do solo, restringindo a capacidade das plantas de absorver água. Como consequência imediata desse déficit hídrico induzido pela salinidade (efeito osmótico), o crescimento das plantas torna-se mais lento. Em adição, os sais podem ser absorvidos no fluxo transpiratório e atingir níveis tóxicos dentro das plantas, causando uma posterior redução no crescimento devido a efeitos iônicos específicos. Assim, a acumulação de íons nos tecidos (p. ex. folhas velhas) por longos períodos pode causar injúrias e, eventualmente, a morte da planta. Isto se deve, provavelmente, à capacidade limitada das células para compartimentalizar os íons no vacúolo, permitindo que suas concentrações no citosol ou em outras organelas aumentem rapidamente e afetem a atividade de várias enzimas metabólicas. Alternativamente, estes íons podem ser transportados para as paredes celulares e causar a desidratação das células (MUNNS, 2002, 2005).

A interação dos sais com nutrientes minerais presentes no solo é outra consequência do estresse salino, resultando em desbalanços e deficiências nutricionais na planta (ZHU, 2003). Tais reduções na absorção de nutrientes essenciais em decorrência da salinidade são devidas, principalmente, a mecanismos de competitividade e/ou alteração estrutural das membranas celulares (GRATTAN; GRIEVE, 1999; LÜTTGE, 1993). Alterações no balanço

nutricional da planta resultam em altas taxas $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Na^+/K^+ , $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$, $\text{Cl}^-/\text{NO}_3^-$ e $\text{Cl}^-/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, as quais têm sido frequentemente relacionadas com reduções no crescimento, inibição da fotossíntese e desestabilização de membranas (CHARTZOULAKIS *et al.*, 2002; REJILI *et al.*, 2007; SALAMA *et al.*, 2007). Secundariamente, o acúmulo excessivo de sais altera o metabolismo das plantas aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são tóxicas para as células em altas concentrações por causarem danos oxidativos em lipídios de membrana, proteínas e ácidos nucleicos (AZEVEDO-NETO; GOMES-FILHO; PRISCO, 2008; CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005).

Existe grande variabilidade de comportamento entre as culturas com relação aos limites de tolerância à salinidade. Enquanto algumas espécies apresentam elevadas tolerâncias à salinidade, outras são susceptíveis ou moderadamente tolerantes. As plantas tolerantes a elevadas concentrações salinas são classificadas como halófitas, que crescem rápido ou lentamente em concentrações de NaCl de 200 a 300 mM e chegam a tolerar concentrações deste sal de até 700 mM (GREENWAY; MUNNS, 1980). As halófitas desenvolveram ao longo da evolução mecanismos morfofisiológicos que as tornaram capazes de enfrentar o excesso de sais presentes na solução do solo. As glicófitas, por sua vez, apresentam menor tolerância à salinidade e seus crescimentos são inibidos em concentrações de NaCl até 100 mM, enquanto que entre 100 e 200 mM de NaCl somente as mais tolerantes conseguem crescer, embora que lentamente (GREENWAY; MUNNS, 1980; PARDO; QUINTERO, 2002). O fato da existência de plantas tolerantes à salinidade (halófitas), bem como a comprovada variabilidade no grau de tolerância intra e interespecífica em plantas sensíveis (glicófitas), são evidências que sugerem a existência de fatores genéticos que influenciam a tolerância aos sais (YAMAGUCHI; BLUMWALD, 2005).

4.2- Parâmetros fotossintéticos e o estresse salino

A fotossíntese ocupa uma posição central entre as vias biossintéticas das plantas, fornecendo uma ligação entre o metabolismo interno da planta e o ambiente externo. O processo fotossintético constitui a base da produção de uma cultura, sendo estimada uma participação de 90% na produção de matéria seca total do vegetal (JIAO; JI; LI, 2003). Durante o estresse salino, as mudanças nas relações hídricas associadas com o acúmulo de íons no interior dos tecidos fotossintéticos têm implicações consideráveis para a atividade fotossintética das plantas. Vários estudos mostram que a redução no crescimento das plantas pode ser acompanhada por decréscimo na taxa de fotossíntese (AZEVEDO NETO *et al.*, 2004; CHARTZOULAKIS *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2012; ROMERO-ARANDA; SORIA; CUARTERO, 2001).

O decréscimo da taxa fotossintética com o aumento da salinidade pode ser devido tanto ao fechamento estomático (minimiza a perda de água nessas condições) como a limitações não estomáticas (BRUGNOLI; BJÖRKMAN, 1992; DREW; HOLE; PICCHIONI, 1990). Inicialmente, quando a concentração de sal na folha é moderada, observa-se um aumento da resistência à difusão do CO₂ através do mesofilo até o sítio de redução nos cloroplastos, afetando desfavoravelmente os processos bioquímicos envolvidos na fotossíntese (PARIDA; DAS; MITTRA, 2004). Em cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.), a baixa concentração de CO₂ nos cloroplastos, resultante da baixa condutância estomática e da elevada resistência difusiva do mesofilo, foi a principal limitação para a fotossíntese em condições de estresse salino (LORETO *et al.*, 2003). Por outro lado, em situações de estresse prolongado, o acúmulo excessivo de íons tóxicos no mesofilo inibe a fotossíntese por meio de mecanismos não-estomáticos. De modo geral, ocorrem mudanças no conteúdo total de pigmentos como a clorofila, redução na atividade de enzimas fotossintéticas e limitações no transporte de elétrons nos cloroplastos, causando decréscimos na eficiência fotoquímica do

fotossistema 2 (PARIDA; DAS; MITTRA, 2003). Bañuls e Primo-Millo (1992) consideram que a inibição na taxa de assimilação de CO₂, em plantas do gênero *Citrus* submetidas à salinidade, é consequência do acúmulo de cloreto nas folhas. Garg e Singla (2004) observaram reduções no conteúdo de clorofila e na atividade da Rubisco em cultivares de grão-de-bico (*Cicer arietinum*) submetidos à salinidade. É relativamente comum em estresses mais severos a ocorrência de necrose dos tecidos foliares e aceleração da senescência de folhas maduras, o que reduz a área destinada à fotossíntese. Os pigmentos fotossintéticos são bons indicadores do nível de estresse nas plantas (HENDRY; PRICE, 1993), por isso seus teores são frequentemente monitorados durante o período de estresse, através de medidas da coloração de folhas e estimativa da concentração de clorofila (PESTANA *et al.*, 2001). A limitação da fotossíntese também pode ser atribuída a uma inibição por *feedback* exercida pelas altas concentrações de açúcar no mesofilo das células foliares frequentemente observadas em plantas sob estresse salino (RABHI *et al.*, 2010).

Parte da energia luminosa absorvida pelos pigmentos cloroplastídicos, especialmente a clorofila *a*, durante a fotossíntese é emitida como fluorescência (BAKER, 2008; GLYNN; FRASER; GILLIAN, 2003). As mudanças na composição e função do aparato fotossintético das plantas em resposta à salinidade têm sido descritas na literatura recente (BROETTO; DUARTE; LÜTTGE, 2007, MATEOS-NARANJO *et al.*, 2010). Demonstrações de que a fluorescência das clorofilas *a* pode ser usada para estimar, rapidamente e de forma não invasiva, a eficiência do transporte de elétrons através do fotossistema 2 (PS2), e de que a eficiência de operação deste fotossistema está correlacionada à assimilação de CO₂, tem levado à utilização de parâmetros da fluorescência das clorofilas *a* com objetivo de examinar o desempenho fotossintético de plantas sob condições de laboratório, em condições controladas e em campo (BAKER; ROSENQVIST, 2004; PERCIVAL; FRASER, 2001; MOUGET; TREMBLIN, 2002). Esta técnica tem permitido também estudos de possíveis

mudanças conformacionais dos tilacóides, o que afetaria a capacidade de absorção e transferência da energia luminosa (KRAUSE; WEIS, 1991). Neste caso, parâmetros como a eficiência quântica máxima do PS2, estimada através da razão entre a fluorescência variável e a máxima (F_v/F_m), expressam o rendimento quântico dos processos fotoquímicos neste fotossistema, quando todos os centros de reação estão abertos, dando uma idéia da eficiência relativa da captura de energia luminosa (BAKER; ROSENQVIST, 2004; PEREIRA, 2001). A eficiência quântica efetiva do PS2 (Φ PSII) indica a fração de energia absorvida pela clorofila associada ao PS2 que foi utilizada em atividade fotoquímica e, como tal, informa a quantidade de elétrons transportados, sendo um indicativo da fotossíntese (LICHTENTHALER; BUSCHMANN; KNAPP, 2005). O principal fator determinante desta eficiência é a habilidade com que os elétrons são removidos da quinona receptora do PS2, o que está diretamente relacionado com a taxa de consumo de ATP e NADPH, produtos do transporte fotossintético de elétrons (BAKER; ROSENQVIST, 2004).

Quando as plantas são expostas à luz, os centros de reação do PS2 são progressivamente reduzidos, ocorrendo um aumento da fluorescência da clorofila. Em seguida, a fluorescência decai em um fenômeno chamado extinção da fluorescência (“quenching”). Dois parâmetros básicos descrevem a extinção da fluorescência variável da clorofila durante o período de indução da radiação: a extinção fotoquímica (qP) e a extinção não fotoquímica (NPQ) da fluorescência variável da clorofila (LICHTENTHALER; BUSCHMANN; KNAPP, 2005). A extinção fotoquímica (qP) é iniciada em função do aumento dos elétrons exportados do PS2 devido à ativação das enzimas envolvidas no metabolismo do carbono e da abertura estomática (BAKER; ROSENQVIST, 2004). Krause e Weis (1991) relatam que qP representa a fração de centros de reação abertos do PSII em relação à fração total deste fotossistema. O decaimento da fluorescência máxima da clorofila também ocorre por processos não fotoquímicos, o NPQ indica a dissipação do excesso de

energia radiante na forma de calor (radiação infravermelha) nos complexos antena do PS2. Este processo está intimamente relacionado com a fotoproteção através da dissipação térmica de energia e tem sido correlacionado com a formação de zeaxantina (BAKER, 2008).

As medidas da fluorescência da clorofila *a* têm se mostrado uma ferramenta muito informativa para o estudo dos efeitos de diferentes estresses ambientais sobre a fotossíntese (KALAJI *et al.*, 2011). Estes parâmetros têm sido utilizados inclusive na seleção de plantas com tolerância à salinidade (AZEVEDO-NETO *et al.*, 2011; GLYNN; FRASER; GILLIAN, 2003). A avaliação desses parâmetros durante todo o ciclo de desenvolvimento das plantas possibilita informações mais precisas, já que eles sofrem variações nos diferentes estádios de desenvolvimento (BACARIN; MOSQUIN, 2002). Portanto, medidas simultâneas de fluorescência da clorofila *a* e de trocas gasosas das plantas permitem um melhor entendimento dos efeitos da salinidade sobre o aparato fotossintético durante o crescimento e desenvolvimento vegetal.

4.3- Respostas das plantas à salinidade

As respostas das plantas ao estresse salino e o desenvolvimento da tolerância aos sais envolve uma variedade de mecanismos extremamente complexos, incluindo processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares (BRESSAN; BOHNERT, HASEGAWA, 2008; GREENWAY; MUNNS, 1980; HASEGAWA *et al.*, 2000; PARIDA; DAS, 2005). As estratégias incluem: 1- alterações morfológicas e desenvolvimentais (p. ex. ciclo de vida e crescimento da parte aérea); 2- ajuste no transporte de íons (p. ex. absorção, extrusão e compartimentalização de íons) e 3- mudanças metabólicas (p. ex. metabolismo do carbono e síntese de solutos compatíveis) (XIONG; ZHU, 2002). Dessa forma, vários aspectos da fisiologia e do metabolismo das plantas são afetados em resposta à salinidade. Embora algumas dessas mudanças sejam claramente adaptativas, outras podem indicar simplesmente

consequências de distúrbios metabólicos/celulares provocados pelo estresse. Com isso, a compreensão da percepção do estresse pelas plantas e das etapas que se seguem tem sido considerada de fundamental importância para o esclarecimento dos mecanismos responsáveis pela sensibilidade ou tolerância à salinidade (BRESSAN; BOHNERT, HASEGAWA, 2008; ZHU, 2001b, 2002).

A percepção das mudanças ambientais e a subsequente adaptação das plantas à salinidade seguem complexas vias de transdução de sinal (VINOCUR; ALTMAN, 2005). Nos últimos anos, grandes avanços foram obtidos com respeito às vias de sinalização celular e aos componentes moleculares envolvidos, e estes resultaram em um sistema geral para explicar a percepção do estresse salino em plantas. Supostamente, as vias de sinalização celular são iniciadas quando um receptor, localizado na plasmalema, detecta o estresse e, então, transmite o sinal através de um grande número de componentes intracelulares localizados a jusante, tais como proteínas, lipídios, hormônios vegetais, cálcio e EROs. Muitas vezes, estes eventos iniciam uma cascata de fosforilação que ativa os fatores de transcrição responsáveis pelo controle da expressão de genes relacionados ao estresse (MAHAJAN; TUTEJA, 2005). Se todos os passos na via de sinalização forem bem-sucedidos, os produtos destes “genes do estresse” podem promover a adaptação da planta às condições de salinidade (VINOCUR; ALTMAN, 2005).

Provavelmente, tanto o componente osmótico quanto o iônico do estresse salino são percebidos pelas células vegetais. Em *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, Urao *et al.* (1999) descreveram uma proteína (ATHK1) homóloga a um osmo-sensor de levedura, sugerindo que a ATHK1 desempenha nas plantas superiores um papel semelhante na percepção do estresse osmótico. Acredita-se que este receptor seja capaz de reconhecer o estresse através da mudança na osmolalidade do meio provocado pelas altas concentrações de sais. Além do mais, o estresse osmótico induz a síntese de ácido abscísico (ABA), o qual aumenta a

expressão do gene *AtNHX1* que codifica para um transportador vacuolar Na^+/H^+ do tipo antiporte (SHI; ZHU, 2002).

Algumas evidências sugerem que a abertura de diversos canais iônicos presentes na membrana plasmática e no tonoplasto estaria envolvida na percepção do estresse iônico induzido pela salinidade (TYERMAN; SKERRETT, 1999). É possível que mudanças no potencial de membrana causadas pela entrada de Na^+ no citosol promova a abertura de canais de Ca^{2+} , e estes ativem vias de transdução para a percepção do estresse, além de induzirem a abertura de outros canais, tais como os de Cl^- e K^+ , resultando em mudanças na turgescência. Neste caso, o potencial de membrana poderia agir como um receptor primário dos sinais do estresse.

Considerando os efeitos do estresse salino, três aspectos são de grande relevância para as respostas aclimatativas ou provavelmente adaptativas das plantas: (a) manutenção da homeostase celular, que inclui a homeostase iônica e a homeostase osmótica ou ajustamento osmótico; (b) controle dos danos e reparo; e (c) retomada do crescimento (ZHU, 2002). Dessa forma, existem vias de sinalização distintas e interconectadas que parecem determinar a tolerância das plantas à salinidade. Para o aspecto iônico do estresse salino, uma via de sinalização baseada nos genes *SOS* (*salt overly sensitive*) tem sido estabelecida. Evidências genéticas sugerem que um sinal de cálcio citosólico gerado pelas altas concentrações de Na^+ ativa uma proteína ligadora de Ca^{2+} (SOS3), a qual se liga e ativa uma proteína quinase do tipo serina/treonina (SOS2). O complexo entre estas duas proteínas, então, regula a expressão e a atividade de transportadores iônicos que realizam o antiporte Na^+/H^+ na membrana plasmática (SOS1) ou no tonoplasto (NHX), resultando na exclusão do excesso de Na^+ do citosol e no restabelecimento da homeostase iônica (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005; ZHU, 2002, 2003).

Sinais de estresse osmótico, como a perda da turgescência celular, parecem desencadear cascatas de fosforilação de proteínas que são centrais para a adaptação das plantas. De fato, várias proteínas do tipo quinase (*protein kinase* - PK) foram identificadas em plantas. Elas participam nas vias de transdução de sinal que respondem a estresses osmóticos, incluindo o estresse salino (ZHU, 2001b). A cascata de MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), por exemplo, envolve pelo menos três módulos de quinases (MAPKKK, MAPKK e MAPK), os quais estão ligados de alguma forma a receptores a montante (sensores/receptores nas membranas) e alvos a jusante (fatores de transcrição, genes). Os possíveis produtos desta cascata de transdução de sinais incluem a expressão gênica e/ou ativação de enzimas envolvidas na biossíntese de solutos compatíveis (ex. prolina e glicinabetaina) para o ajustamento osmótico (ZHU, 2002).

Embora algumas das respostas das plantas à salinidade sejam manifestadas por sinais primários (iônicos e osmóticos) de estresse, outras podem resultar de sinais/estresses secundários produzidos com o decurso do estresse salino. Isto inclui, por exemplo, a produção de hormônios do estresse (ex. ABA e etileno) e mensageiros secundários (ex. fosfolipídios), a desnaturação de proteínas e o aumento da produção de EROs, ocasionando o chamado estresse oxidativo (XIONG; ZHU, 2002). Em geral, as respostas das plantas a estes sinais secundários são consideradas como parte das vias de destoxificação celular (ZHU, 2002). Estas vias de transdução regulam a expressão de genes que possivelmente estão envolvidos em diversos mecanismos de controle e reparo de danos causados pelo estresse. Dentre as principais vias estudadas, destacam-se aquelas que levam à síntese de proteínas do tipo LEA (*late embryogenesis abundant*), de chaperonas moleculares (ex. *heat shock protein* - HSP) e de proteases que removem as proteínas desnaturadas ou danificadas, bem como aquelas envolvidas na síntese e/ou ativação de enzimas produtoras ou removedoras de EROs (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005; NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2002;

XIONG; ZHU, 2002). Ao que tudo indica, além de regularem a homeostase osmótica, as cascatas MAPK também participam das vias para destoxificação respondendo a diversos estímulos (ZHU, 2001a, 2002).

Uma das respostas iniciais das plantas à salinidade envolve a redução do crescimento vegetativo, principalmente o da parte aérea. Supostamente, isto se deve aos efeitos diretos do estresse salino sobre os processos de divisão e expansão celulares (GREENWAY; MUNNS, 1980; MUNNS, 2002). Em condições de estresse osmótico, as atividades das CDKs (*cyclin-dependent kinases*), proteínas que dirigem o ciclo celular, são reduzidas devido à indução de inibidores de CDKs por ABA (WANG *et al.*, 1998). Além disso, o ABA produzido nas raízes pode subir pelo fluxo transpiratório e causar o fechamento dos estômatos nas folhas, reduzindo a fotossíntese e, portanto, o crescimento das plantas (DAVIES; ZHANG, 1991). Embora a ligação entre os processos de sinalização do estresse salino e de regulação das CDKs não seja totalmente compreendida, é possível que as respostas de inibição do crescimento sejam reguladas negativamente pelas vias de homeostase e de destoxificação das células (ZHU, 2002). Assim, uma vez restabelecida as homeostases iônica e osmótica, e os danos celulares prevenidos e reparados, as plantas devem ser capazes de retomar seus crescimentos sob condições de estresse, mesmo que a uma velocidade reduzida.

4.4- Homeostases osmóticas e iônicas de plantas sob estresse salino

O ajustamento osmótico ou osmorregulação é um processo pelo qual o potencial osmótico celular é reduzido, devido ao acúmulo líquido de solutos inorgânicos e orgânicos, acarretando diminuição do potencial hídrico, sem que ocorra diminuição na turgescência celular (TAIZ; ZEIGER, 2009). É, portanto, uma resposta das plantas ao abaixamento do potencial hídrico do meio de cultivo, cuja principal finalidade é a manutenção da absorção de água. Este fenômeno ocorre tanto em halófitas quanto em glicófitas (HASEGAWA *et al.*,

2000) e tem sido considerado um importante mecanismo de aclimatação das plantas às condições de seca ou de salinidade. O ajustamento osmótico pode contribuir para a manutenção de processos fisiológicos, tais como a abertura estomática, a fotossíntese e a expansão celular (SERRAJ; SINCLAIR, 2002). Em geral, os solutos inorgânicos, principalmente os íons Na^+ e Cl^- , são compartimentalizados no vacúolo, enquanto os orgânicos (carboidratos solúveis, N-aminossolúveis, prolina, betaínas, etc.) acumulam-se no citosol, equilibrando desta forma o potencial hídrico entre os diversos compartimentos celulares (ASHRAF; HARRIS, 2004; PRISCO; GOMES-FILHO, 2010). Do ponto de vista energético, o ajustamento osmótico utilizando íons inorgânicos é menos dispendioso do que através da síntese de solutos orgânicos (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005; YEO, 1983), a qual pode limitar o crescimento por desviar substratos de vias metabólicas essenciais para o crescimento, tais como a síntese de proteínas e de parede celular (MUNNS, 2005).

O acúmulo de solutos orgânicos é um processo comum em plantas submetidas a estresses ambientais, tais como o hídrico e o salino (MUNNS, 2002). Estes compostos compartilham a propriedade de permanecerem invariáveis em pH neutro e serem altamente solúveis em água (HASEGAWA *et al.*, 2000). Ao contrário dos solutos inorgânicos, que inibem as atividades de muitas enzimas citosólicas, os solutos orgânicos, mesmo em altas concentrações, não interferem no metabolismo celular normal, sendo por isso também chamados de solutos compatíveis (SAIRAM; TYAGI, 2004). Em adição ao seu papel na osmorregulação, acredita-se também que os solutos orgânicos possam contribuir para a estabilidade das proteínas e das membranas celulares, bem como exercer efeitos protetores contra espécies reativas de oxigênio (ASHRAF; FOOLAD, 2007; GREENWAY; MUNNS, 1980; SMIRNOFF, 1998). De acordo com Koyro (2006), a habilidade da halófito *Plantago coronopus* (L.) para enfrentar a salinidade está relacionada com a manutenção de altos níveis

de carboidratos solúveis, os quais serviriam tanto para o ajustamento osmótico como para a estabilização de estruturas celulares.

O acúmulo de prolina ocorre em diversas plantas submetidas a estresses abióticos, como o salino, sendo geralmente o aumento percentual maior do que a de outros aminoácidos. Especula-se que além do seu papel osmótico, a prolina regula o estoque de N na célula e protege as membranas contra danos causados pelos sais, estabilizando-as (ASHRAF; HARRIS, 2004). No entanto, o papel da prolina na tolerância ao estresse salino tem sido questionado por alguns autores. Liu e Zhu (1997), utilizando mutantes *sos1* de *Arabidopsis thaliana* sensíveis ao estresse salino, observaram que estes acumulavam mais prolina que os tipos selvagens (tolerantes). No entanto, a ausência de uma correlação positiva entre o acúmulo de prolina e a osmorregulação em algumas espécies não nega um papel adaptativo para a prolina. Nessas espécies, este fato pode refletir a predominância de outros mecanismos adaptativos, tais como alterações morfológicas (p. ex. desenvolvimento de sistema radicular mais profundo), desenvolvimentais (p. ex. redução do tempo de floração), fisiológicas (p. ex. sequestro de íons no vacúolo) ou bioquímicas (p. ex. síntese e acúmulo preferencial de outros solutos orgânicos).

A sobrevivência das plantas em ambientes salinos também depende da manutenção da concentração iônica intracelular, a qual é importante para a manutenção dos processos metabólicos que controlam o crescimento e o desenvolvimento da planta (NIU *et al.*, 1995). Contudo, a absorção elevada de íons Na^+ em condições de salinidade pode gerar toxicidade e impedir a aquisição de alguns nutrientes essenciais, gerando desbalanço iônico (BRESSAN; BOHNERT, HASEGAWA, 2008; ZHU, 2003). Com relação a este último fator, uma atenção maior tem sido dada ao estudo dos efeitos do estresse salino sobre a nutrição potássica das plantas. Isto se deve, principalmente, às similaridades físico-químicas entre os íons Na^+ e K^+ (MAATHUIS; AMTMANN, 1999; MÄSER *et al.*, 2002; TESTER; DAVENPORT, 2003).

Para a maioria das plantas, o potássio é o principal nutriente inorgânico catiônico e desempenha várias funções na planta, tais como: 1- manutenção do potencial de membrana; 2- balanceamento de cargas no citoplasma, estabilizando o excesso de cargas negativas das proteínas e dos ácidos nucleicos; 3- serve como cofator para a ativação de reações enzimáticas e 4- contribui para a pressão osmótica do vacúolo e, assim, para a manutenção da turgescência celular (MAATHUIS; AMTMANN, 1999). Embora o Na^+ possa substituir o K^+ nas suas funções osmóticas dentro do vacúolo, um excesso de Na^+ é indesejável, pois prejudica os sistemas enzimáticos do citosol (FLOWERS; TROKE; YEO, 1977). Dessa forma, a capacidade das plantas de manterem altas relações K^+/Na^+ no citosol tem sido sugerida como um dos elementos-chave para tolerar o estresse salino e é muitas vezes utilizada como critério para selecionar materiais sensíveis e tolerantes à salinidade (AKTAS; ABAK; CAKMAK, 2006; ASHRAF; HARRIS, 2004; EKER *et al.*, 2006). A manutenção da relação K^+/Na^+ no citosol depende dos processos que controlam a absorção, a translocação e a compartimentalização de Na^+ nos vacúolos (MAATHUIS; AMTMANN, 1999). A alteração nessa relação a favor do íon Na^+ resulta do influxo passivo do sódio para dentro da célula através das vias de aquisição de potássio, favorecido pelo gradiente de potencial eletroquímico (APSE; BLUMWALD, 2002; BLUMWALD, 2000).

O influxo de sódio segue o gradiente de concentração e é favorecido pelo potencial de membrana negativo da célula, em torno de -180 mV (MUNNS, 2005). O Na^+ pode entrar na célula através dos transportadores de K^+ devido à similaridade dos seus raios iônicos hidratados, que dificulta a discriminação desses dois íons pela proteína transportadora (BLUMWALD; AHARON; APSE, 2000). Nesse caso, transportadores de alta e de baixa afinidade por K^+ podem atuar no transporte de Na^+ quando este se encontra em altas concentrações no solo (MAATHUIS; AMTMANN, 1999). Além dos transportadores de K^+ , outra via de absorção do sódio parece acontecer através de canais iônicos não-seletivos

(canais do tipo VICs - do Inglês, *voltage independent channels*), os quais têm recebido bastante atenção porque parecem ser inibidos por Ca^{2+} e, portanto, devem ser cruciais para a tolerância aos sais (AMTMANN; SANDERS, 1999). Adicionalmente, em algumas espécies vegetais como o arroz, o transporte de Na^+ através da via apoplástica é responsável pela presença de altas concentrações desse íon no fluxo transpiratório (YEO *et al.*, 1999).

Nas plantas, o principal mecanismo para o efluxo de Na^+ é mediado pelas H^+ -ATPases de membrana plasmática (BLUMWALD, 2000; MANSOUR *et al.*, 2003). As H^+ -ATPases são bombas eletrogênicas que realizam o transporte ativo primário de H^+ para fora da célula utilizando a energia proveniente da hidrólise do ATP (NIU *et al.*, 1995). Como consequência, é gerado um gradiente de potencial eletroquímico que é utilizado na extrusão de Na^+ mediada por transportadores Na^+/H^+ do tipo antiporte presentes na membrana plasmática, os quais acoplam o movimento passivo de H^+ para dentro da célula ao movimento ativo de Na^+ para fora da célula, contra um gradiente de potencial eletroquímico (APSE; BLUMWALD, 2002; BLUMWALD; AHARON; APSE, 2000). A comparação dos níveis de expressão da H^+ -ATPase de uma glicófito (*Nicotiana tabacum*) e de uma halófito (*Atriplex nummularia*), mostraram que a tolerância ao sal estava positivamente correlacionada com os níveis de transcritos (NIU *et al.*, 1993).

Além do efluxo de Na^+ através da membrana plasmática, outro mecanismo importante para a manutenção da homeostase iônica é a compartimentalização dos íons no vacúolo. Esta é mediada por um transportador vacuolar Na^+/H^+ do tipo antiporte que utiliza o gradiente de potencial eletroquímico gerado pelas H^+ -ATPases e pirofosfatases localizadas na membrana do vacúolo (APSE; BLUMWALD, 2002). O funcionamento desses transportadores Na^+/H^+ do tipo antiporte é, provavelmente, de grande importância em plantas halotolerantes, enquanto que nas glicófitas com baixa tolerância aos sais, esse mecanismo não parece ser tão eficiente (GREENWAY; MUNNS, 1980). O acúmulo de grandes quantidades de Na^+ (e Cl^-) no

vacúolo, evita seus efeitos deletérios em outras partes do citoplasma e favorece a entrada de água para dentro da célula mesmo em um ambiente de baixo potencial osmótico e hídrico (BLUMWALD, 2000; ZHU, 2003).

A superexpressão do gene *AtNHX1*, que codifica um transportador vacuolar Na^+/H^+ do tipo antiporte, conferiu maior tolerância às condições de estresse salino em plantas de *Arabidopsis thaliana* (APSE *et al.*, 1999), tomate (ZHANG; BLUMWALD, 2001) e trigo (XUE *et al.*, 2004). Em adição, Gaxiola *et al.* (2001) demonstraram, em experimentos realizados com *A. thaliana*, que a superexpressão do gene *AVP1*, o qual codifica para uma pirofosfatase vacuolar, também aumentou a tolerância das plantas à salinidade.

Os mecanismos que controlam a absorção e a acumulação do Cl^- também são de grande relevância para a homeostase iônica das plantas em condições de salinidade. Contudo, ao contrário do que se tem para o Na^+ , o modo de absorção do Cl^- pelas plantas e o controle da sua concentração nas células vegetais são ainda controversos (TYERMANN; SKERRETT, 1999). Felle (1994), mostrou que o aumento da concentração de Cl^- no meio externo levou a uma diminuição transiente do pH citosólico das células radiculares de *Sinapis alba*, sugerindo que a sua absorção se dá por um processo ativo controlado por um simporte $\text{Cl}/n\text{H}^+$, onde $n > 1$. Contudo, não existem evidências de que isto também constitua uma rota para o influxo de Cl^- em condições de estresse salino. Alternativamente, em altas concentrações de sais, esse transporte ocorreria passivamente através de canais permeáveis ao nitrato (SKERRETT; TYERMANN, 1994).

Lorenzen, Aberle e Plieth (2004), trabalhando com *A. thaliana* em condições salinas (100 mM de NaCl), demonstraram que o influxo passivo de Cl^- se dava através de canais. Estes mesmos autores também verificaram que a diminuição do gradiente de pH transmembranar (aumento do pH externo) não era acompanhada por uma redução significativa na concentração de Cl^- citosólico. Em adição, eles observaram uma inibição do

influxo de Cl^- mediada por Ca^{2+} , o qual pode agir sobre os canais de cátions prevenindo, dessa forma, a despolarização da membrana necessária para a absorção passiva do Cl^- nas raízes. Como já é bem conhecido que o Ca^{2+} reduz o influxo de Na^+ em condições de estresse salino (TESTER; DAVENPORT, 2003), tais resultados sugerem que os mecanismos de transporte de Na^+ e Cl^- podem ser termodinamicamente acoplados.

A compartimentalização vacuolar do cloreto é uma adaptação essencial para a tolerância ao estresse salino (NIU *et al.*, 1995). Alguns autores sugerem que a compartimentalização do Cl^- no vacúolo pode ser alcançada através de canais, sendo o gradiente de pH gerado pelo bombeamento de prótons através do tonoplasto a principal força termodinâmica para o transporte. Alternativamente, a compartimentalização do Cl^- no vacúolo poderia ocorrer ativamente por um transportador H^+ /ânion do tipo antiporte (NIU *et al.*, 1995; REA; SANDERS, 1987).

4.5- Expressão gênica versus estresse salino: mecanismos de tolerância

Como visto anteriormente, as vias de transdução de sinais são bastante complexas e envolvem um grande número de componentes. Todas essas vias têm como finalidade a ativação da expressão gênica, a qual possibilita às plantas executar uma resposta programada para determinado estímulo. Dessa forma, a análise da expressão gênica em plantas submetidas ao estresse salino é de fundamental importância para a compreensão dos mecanismos de tolerância (MUNNS, 2005).

O desenvolvimento de técnicas modernas de análise da expressão dos genes e de seus produtos, tais como a poderosa ferramenta do “*DNA microarray*” e a renomada técnica de eletroforese 2D, junto com o crescente número de plantas com genomas sequenciados, abriu novas perspectivas para a identificação de genes cuja expressão é induzida em resposta ao estresse salino (SALEKDEH *et al.*, 2002; SHA VALLI KHAN *et al.*, 2007). Utilizando a

tecnologia do “*DNA microarray*” para monitorar a expressão de 1.728 genes de plantas de arroz submetidas ao estresse salino, Kawasaki *et al.* (2001) demonstraram que muitos genes são induzidos em apenas 15 min após a aplicação do estresse (150 mM de NaCl), enquanto outros tiveram padrões de expressão bastante diferenciados no decorrer de horas ou semanas após o início do tratamento salino. Todavia, outros relatos obtidos com a mesma metodologia têm mostrado que uma proporção significativa dos genes induzidos pela salinidade não é específica para este estresse, uma vez que os mesmos são induzidos por outros estresses abióticos (MUNNS, 2005). Por exemplo, Seki *et al.* (2002), monitorando a expressão de 7.000 genes de *Arabidopsis* submetida aos estresses hídrico, de frio ou salino, verificaram que dos 167 genes que foram induzidos pelo estresse salino (250 mM de NaCl), apenas 15 foram especificamente induzidos pelo sal. Este fato torna ainda mais difícil e complexo o estudo e compreensão da expressão dos “genes do estresse”.

Os genes que apresentam sua expressão modificada pelo estresse salino codificam para uma variedade de proteínas, as quais contribuem para o sucesso de importantes mecanismos de tolerância. Os genes candidatos a conferirem tolerância à salinidade têm sido agrupados funcionalmente em algumas categorias importantes (MUNNS, 2005). Uma categoria inclui genes que atuam na homeostase iônica e que codificam para proteínas transportadoras de íons, tais como as que realizam o antiporte Na^+/H^+ na membrana plasmática, para a extrusão do Na^+ da célula, e no tonoplasto, para compartimentalizá-lo no vacúolo (BLUMWALD; AHARON; APSE, 2000; ZHU, 2003). Além destas proteínas, a ação de bombas H^+ -ATPases (na plasmalema e no vacúolo) e H^+ -pirofosfatases (no vacúolo), bem como a de transportadores de K^+ de alta afinidade, contribuem para a homeostase iônica das plantas em condições de salinidade (RODRÍGUEZ-NAVARRO; RUBIO, 2006; XIONG; ZHU, 2002).

Outros genes regulados pela salinidade funcionam na homeostase osmótica; os produtos destes genes incluem, por exemplo, proteínas que controlam o fluxo de água (aquaporinas) e enzimas ligadas às vias biossintéticas de solutos compatíveis (sintetase da pirrolina-5-carboxilato, monoxigenase da colina, hidrogenase do aldeído betaínico, etc.) (ZHU, 2002). Além de seu papel estritamente osmótico, especula-se o papel desses solutos em processos de destoxificação e prevenção de danos (PARIDA; DAS, 2005). De fato, vários dos genes induzidos pelo estresse salino codificam para proteínas que atuam no controle e reparo de danos, tais como as LEAs e deidrinhas relacionadas, as HSPs, algumas enzimas relacionadas à ubiquitinação, proteases e as enzimas de destoxificação de EROs (catalase, peroxidases, dismutase do superóxido, etc.) (MUÑOZ-MAYOR *et al.*, 2012; SAIRAM; TYAGI, 2004; XIONG; ZHU, 2002; ZHU, 2001a).

Outra categoria de genes que respondem à salinidade inclui os que codificam para proteínas regulatórias, como os fatores de transcrição, PKs (ex. MAPK e *calcium-dependent protein kinase* - CDPK), fosfatases, etc. Tais genes estão provavelmente sob controle hormonal e participam de vias de sinalização que regulam a atividade de outros genes responsáveis pelo controle das taxas de crescimento das plantas em ambientes salinos (MUNNS, 2005).

Os genes que participam dos mecanismos de tolerância ao sal apresentam modos de regulação complexos (MAHAJAN; TUTEJA, 2005; ZHU, 2002). Os “genes de resposta precoce” são induzidos rapidamente após a percepção do estresse (em minutos). A indução destes genes é transitória e não requer síntese de proteínas, uma vez que todos os componentes de sinalização já estão presentes. Por outro lado, “genes de resposta tardia”, os quais constituem a maioria dos genes que respondem ao estresse salino, são ativados mais lentamente (em horas) e suas expressões são frequentemente mantidas durante todo o período de estresse. Tipicamente, “genes de resposta precoce” codificam para fatores de transcrição

que ativam “genes de resposta tardia”, provavelmente os efetores da tolerância ao estresse salino (SAIRAM; TYAGI, 2004).

Recentemente, os mecanismos moleculares e os possíveis alvos para a engenharia genética de plantas tolerantes a estresses abióticos, incluindo o salino, têm sido revisados por vários pesquisadores (CHEN; MURATA, 2002; CUSHMAN; BOHNERT, 2000; FLOWERS, 2004; VINOCUR; ALTMAN, 2005; SHAO *et al.*, 2007). Contudo, as funções fisiológicas e bioquímicas de muitos genes regulados pelo estresse salino ainda permanecem desconhecidas.

4.6- Proteômica de plantas sob estresse salino

Como mencionado anteriormente, a resposta das plantas ao estresse salino ocorre em vários níveis moleculares, iniciando com a percepção do sinal, passando pela ativação de genes específicos para o estresse e finalizando com a produção de compostos capazes de proteger a célula contra os adventos do estresse, dentre eles as proteínas (ZHU, 2001; SAIRAM; TYAGI, 2004).

Durante os últimos anos, a análise sistemática da população de proteínas expressas, denominadas coletivamente como proteoma (WILKINS *et al.*, 1996), tornou-se um dos enfoques mais promissores para se compreender a função e a regulação dos genes responsáveis pelos mecanismos de adaptação das plantas aos estresses ambientais (RAMPITSCH; SRINIVASAN, 2006). Com a análise proteômica, dados importantes podem ser obtidos a respeito dos produtos gênicos que estão sendo transcritos e traduzidos, incluindo suas concentrações relativas e as modificações pós-traducionais que são essenciais para a atividade de muitas proteínas (SALEKDEH *et al.*, 2002).

O avanço da proteômica é devido, em parte, ao crescente desenvolvimento das técnicas de separação das proteínas por eletroforese 2D e da identificação das mesmas por espectrometria de massas (WESTERMEIER; LOYLAND; ASBURY, 2002). Estas técnicas

são centrais em todo estudo proteômico, especialmente nos que empregam uma abordagem comparativa a fim de caracterizar as diferenças no proteoma ocasionadas por certos estímulos, como mudanças no estágio de desenvolvimento e estresses ambientais. Neste caso, os passos críticos no emprego da proteômica em plantas são: (1) a extração e solubilização das proteínas; (2) a separação das proteínas por eletroforese 2D e sua digestão em peptídeos com uma enzima proteolítica, tal como a tripsina; (3) a dissociação/ionização e determinação das massas dos fragmentos peptídicos por espectrometria de massas; e (4) análise dos dados para suposta identificação das proteínas de interesse (RAMPITSCH; SRINIVASAN, 2006). Uma das estratégias mais usadas para obter a identidade de proteínas é o mapeamento das massas dos peptídeos (*peptide mass fingerprint* - PMF). Através dele, os padrões de massas obtidos de proteínas desconhecidas podem ser comparados com aqueles de proteínas anotadas. Apesar de rápido e prático, este método requer que a sequência da proteína ou a região correspondente no genoma estejam presentes nos bancos de dados (SALEKDEH *et al.*, 2002). Assim, faz-se necessária a utilização de métodos complementares para dar mais certeza sobre a identidade das proteínas, especialmente quando a espécie estudada possui poucas informações genômicas (RAMPITSCH; SRINIVASAN, 2006). Neste aspecto, outras estratégias envolvem o sequenciamento (N-terminal ou interno) das proteínas por meios bioquímicos clássicos como a degradação de Edman, ou ainda, a obtenção de dados de sequências dos fragmentos peptídeos por espectrometria de massas em tandem (MS/MS). Estas sequências podem, então, ser submetidas em programas de busca específicos que permitam a identificação cruzada das proteínas por homologia (RAMPITSCH; SRINIVASAN, 2006; SHEVCHENKO *et al.*, 2001). Além disso, tais informações sobre as proteínas podem ser utilizadas no isolamento dos cDNAs e genes correspondentes (JELLOULI *et al.*, 2008; SALEKDEH *et al.*, 2002).

Recentemente, vários trabalhos com uma abordagem proteômica foram realizados para diferentes espécies e cultivares de plantas sob condições de salinidade. Em trigo (*Triticum durum* L.), a comparação dos proteomas de folhas, obtidos a partir de plantas controle e estressadas (100 mM de NaCl), levou à identificação de 38 proteínas cujos níveis de expressão foram alterados pelo estresse (CARUSO *et al.*, 2008). As proteínas identificadas pertenciam a importantes processos fisiológicos (metabolismos de carboidratos, de aminoácidos, do nitrogênio e energético) e de defesa (eliminação de EROs). Eles identificaram também a enzima glutamina sintetase, a qual estaria relacionada com a síntese do aminoácido prolina, usualmente relacionado com a tolerância de plantas a estresses abióticos.

Em plântulas de painço (*Setaria italica* L.), Veeranagamallaiah *et al.* (2008) avaliaram as mudanças no proteoma em resposta aos tratamentos com NaCl (100, 150 e 200 mM) e identificaram um total de 29 proteínas diferencialmente expressas pelo sal. Por sua vez, Kav *et al.* (2004) realizando um estudo proteômico em raízes de ervilha (*Pisum sativum* L.), sugeriram a existência de uma via de transdução de sinal que poderia estar envolvida nas respostas aos estresses abióticos. Utilizando uma abordagem proteômica, Aghaei *et al.* (2009) investigaram as mudanças no perfil de expressão de proteínas em hipocótilos e raízes de soja (*Glycine max* L.) submetidas à salinidade. Embora não tenham sido identificadas, várias proteínas diferencialmente expressas também foram observadas em plântulas de *Vigna unguiculata* submetidas ao estresse salino (SOUZA *et al.*, 2003).

Como sugerido acima, a aclimação das plantas ao estresse está associada com profundas mudanças na expressão gênica e na composição do proteoma. No entanto, deve-se levar em consideração que as mudanças na expressão de genes a nível de transcritos (mRNA) nem sempre mantêm relação direta com os níveis de proteínas (MANN; JENSEN, 2003). Além do mais, tem se tornado cada vez mais evidente que uma proteína pode exibir funções

biológicas diversificadas dependendo da sua localização subcelular, das modificações pós-traducionais que sofre e do padrão de interação com outras proteínas e outras biomoléculas (CUI *et al.*, 2005; KOSOVÁ *et al.*, 2011). Portanto, as investigações das mudanças do proteoma das plantas são de extrema importância, desde que as proteínas, ao contrário dos transcritos, são os efetores diretos das respostas ao estresse. Estas proteínas incluem não somente as enzimas catalisadoras de mudanças metabólicas, mas também aquelas que compõem a maquinaria de transcrição e tradução da célula, ou seja, elas também regulam as respostas das plantas tanto a nível de transcritos quanto de proteínas (VINOCUR; ALTMAN, 2005). Em geral, existe um grande número de informações a respeito das mudanças metabólicas e das proteínas com ações protetoras induzidas por diferentes tipos de estresses abióticos, enquanto isso, muito pouco se conhece sobre as proteínas regulatórias menos abundantes no proteoma, as quais estão envolvidas na sinalização do estresse e na regulação da expressão gênica (KOSOVÁ *et al.*, 2011).

A maioria das investigações da composição do proteoma em condições de salinidade compara as proteínas isoladas de plantas não estressadas (controle) com as de plantas sob estresse. Outras abordagens incluem a comparação de proteomas a partir de dois genótipos ou espécies diferentes com níveis contrastantes de tolerância ao estresse salino (KOSOVÁ *et al.*, 2011). Uma comparação das mudanças no proteoma sob estresse salino em *Arabidopsis thaliana*, uma glicófita, e *Thellungiella halophila*, uma halófita, mostrou que a salinidade causou menos alterações em *T. halophila* do que em *A. thaliana*, com 37 e 88 proteínas expressas diferencialmente sob estresse, respectivamente (PANG *et al.*, 2010). Em *T. halophila* foram encontrados aumentos na expressão de enzimas envolvidas na assimilação do carbono (p. ex. ativase da rubisco) e na biossíntese de prolina, bem como de proteínas ribossômicas e de um fator de iniciação da tradução (eIF3A). Nas folhas da halófita *Suaeda aegyptiaca*, um estudo proteômico dos efeitos do NaCl revelou o aumento na expressão de

várias proteínas envolvidas com a tolerância ao estresse oxidativo (peroxidase da glutatona e dismutase do superóxido) induzido pelo sal, com a síntese de glicina betaína (monoxigenase da colina), com a fotossíntese (proteínas D1 e D2 do centro de reação do fotossistema 2) e com a degradação de íons cianeto produzidos durante a síntese do etileno (ASKARI *et al.*, 2006).

Tendo em vista a complexidade particular de amostras obtidas a partir dos tecidos vegetais, especialmente em termos de proteínas, muitos outros trabalhos têm focado, recentemente, no estudo do proteoma organelar em frações subcelulares (YAN; AEBERSOLD; RAINES, 2009). Tal estratégia pode complementar os estudos de análise comparativa, permitindo a identificação de um número maior de proteínas e revelando informações importantes a respeito de suas localizações subcelulares (SHA VALLI KHAN *et al.*, 2007). Dentre as organelas que têm tido seus proteomas inspecionados, destacam-se os cloroplastos, as mitocôndrias e os peroxissomos, as quais são responsáveis pelos principais processos metabólicos nas plantas, incluindo: a fotossíntese, a fotorrespiração, a fosforilação oxidativa, a β -oxidação e o ciclo do ácido carboxílico (TAYLOR *et al.*, 2009).

Portanto, os estudos do proteoma em um determinado órgão, tecido, célula ou compartimento subcelular, proveniente de plantas estressadas ou não, seguido de identificação e caracterização das proteínas mais relevantes, poderão contribuir para o entendimento dos mecanismos que governam as respostas à salinidade. Os produtos dos “genes do estresse” poderão ser usados futuramente em programas de melhoramento que visem o aumento da tolerância de glicófitas aos sais.

4.7- Origem e importância do feijão de corda

O feijão de corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., é uma dicotiledônea, pertencente a ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo

Phaseolina, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, espécie *V. unguiculata* e subespécie *unguiculata* (FREIRE FILHO *et al.*, 2005). O Oeste da África, mais precisamente a Nigéria, é tido como o centro primário de diversidade da espécie (NG; MARÉCHAL, 1985; STEELE; MEHRA, 1980). Entretanto, Padulosi e Ng (1997) relatam que, provavelmente, a região de Transvaal, na República da África do Sul, seja a região de especiação de *Vigna unguiculata*. Freire Filho (1988) apresenta várias evidências de que o feijão de corda foi introduzido na América Latina no século XVI, pelos colonizadores espanhóis e portugueses, primeiramente nas colônias espanholas e em seguida no Brasil, provavelmente no Estado da Bahia.

O feijão de corda, chamado também de feijão caupi ou feijão macassar, é de grande importância na produção agrícola nordestina, constituindo um alimento básico para a população (TEIXEIRA *et al.*, 1988). Pelo seu alto valor nutricional, o feijão de corda é plantado principalmente para a produção de grãos, visando a alimentação humana. Além disso, seu rendimento de grãos (nutrientes digestíveis), massa seca e massa verde permitem a sua utilização na alimentação animal e, ainda, na rotação de culturas e adubação verde, visando à recuperação da fertilidade dos solos (ARAÚJO *et al.*, 1984). Pela sua rusticidade, exige pouca fertilidade do solo e possui boa capacidade de fixar nitrogênio em simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* (GUAZELLI, 1988).

No Brasil, o feijão de corda é cultivado predominantemente no semi-árido da região Nordeste e em pequenas áreas na Amazônia. No Nordeste, a produção e a produtividade no ano de 2011 foram de 818.436 t e 428 kg/ha, respectivamente. Os maiores produtores foram os Estados do Ceará (264.205 t), Bahia (223.075 t), Pernambuco (107.372 t) e Piauí (79.946 t), os quais também apresentam as maiores áreas plantadas (IBGE, 2012).

Apesar de ser disponibilizada uma grande área para a plantação do feijão de corda, o rendimento dessa cultura ainda é baixo. Dentre os vários fatores que limitam a produção do feijão de corda no Brasil e, em especial, na região Nordeste, pode-se constatar os de origem

biótica (pragas e doenças) e os de origem abiótica (baixa fertilidade, salinidade e pH do solo, seca, etc.). Estudos com plantas de feijão de corda sob estresse salino mostram que há redução no crescimento vegetativo devido ao acúmulo de sais nos tecidos (MURILLO-AMADOR *et al.*, 2006), alterações nas trocas gasosas (PRAXEDES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2003), distúrbios nutricionais (SILVEIRA *et al.*, 2001) e estresse oxidativo (CAVALCANTI *et al.*, 2007). Esses estudos têm contribuído para o esclarecimento parcial dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos de tolerância ao estresse nessa espécie e na identificação de cultivares com tolerância diferencial à salinidade (COSTA *et al.*, 2003). Contudo, por ser uma característica multigênica, é necessário o estudo das diversas alterações moleculares em plantas submetidas à salinidade quando se deseja identificar aspectos ligados à tolerância.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHAEI, K.; EHSANPOUR, A. A.; SHAH, A. H.; KOMATSU, S. Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. **Amino Acids**, v. 36, p. 91-98, 2009.
- AKTAS, H.; ABAK, K.; CAKMAK, I. Genotypic variation in the response of pepper to salinity. **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 260-266, 2006.
- AMTMANN, A.; SANDERS, D. Mechanism of Na⁺ uptake by plant cells. **Advances in Botanical Research**, v. 29, p. 75-112, 1999.
- 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.
- APSE, M. P.; BLUMWALD, E. Engineering salt tolerance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 146-150, 2002.
- ARAÚJO, J. P. P., WATT, E. E. **O Caupi no Brasil**. IITA/EMBRAPA. 1988. 722 p.
- ARAÚJO, J. P. P.; RIOS, G. P.; WATT, E. E.; NEVES, B. P.; FAGERIA, N. K.; OLIVIERA, I. P.; GUIMARÃES, C. M.; SILVIERA FILHO, A. **A cultura do caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.**: descrição e recomendações técnicas de cultivo. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1984. 82 p. (Circular Técnica, 18).
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of Glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206-216, 2007.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v. 166, p. 3-16, 2004.
- ASKARI, H.; EDQVIST, J.; HAJHEIDARI, M.; KAFI, M.; SALEKDEH, G. H. Effect of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptica* leaves. **Proteomics**, v. 6, p. 2546-2554, 2006.
- AZEVEDO NETO, A. D.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T. Salinity and oxidative stress. In: Khan, A. N.; Singh, S. (eds.). **Abiotic stress and plant responses**. New Delhi: I.K. International Publishing House, 2008, p. 57-82.

AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; LACERDA, C. F.; SILVA, J. V.; COSTA, P. H. A.; GOMES-FILHO, E. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 31-38, 2004.

AZEVEDO-NETO, A. D.; PEREIRA, P. P. A.; COSTA, D. P.; SANTOS, A. C. C. Fluorescência da clorofila como uma ferramenta possível para seleção de tolerância à salinidade em girassol. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 893-897, 2011.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Campina Grande: UFPB. 1999. 153 p.

BACARIN, M. A.; MOSQUIN, P. R. Cinética de emissão de fluorescência das clorofilas de dois genótipos de feijoeiro. **Ciência Agrotécnica**, v. 26, p. 705-710, 2002.

BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A probe of photosynthesis In vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89-113, 2008.

BAKER, N. R.; ROSENQVST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1607-1621, 2004.

BAÑULS, J.; PRIMO-MILLO, E. Effects of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of *Citrus* plants. **Physiologia Plantarum**, v. 86, p. 115-123, 1992.

BLUMWALD, E. Sodium transport and salt tolerance in plants. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, p. 431-434, 2000.

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

BRESSAN, R. A.; BOHNERT, H. J.; HASEGAWA, P. M. Genetic engineering for salinity stress tolerance. **Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, p. 347-384, 2008.

- BROETTO, F.; DUARTE, H. M.; LÜTTGE, U. Responses of chlorophyll fluorescence parameters of the facultative halophyte and C₃-CAM intermediate species *Mesembryanthemum crystallinum* to salinity and high irradiance stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 904-912, 2007.
- BRUGNOLI, E.; BJÖRKMAN, 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. 335-347, 1992.
- CARUSO, G.; CAVALIERE, C.; GUARINO, C.; GUBBIOTTI, R.; FOGLIA, P.; LAGANÀ, A. Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 381-390, 2008.
- 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. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 591-600, 2007.
- CHARTZOULAKIS, K. S.; LOUPASSAKI, M.; BERTAKY, M.; ANDROULAKIS, I. Effects of NaCl on growth, ion content and CO₂ assimilation rate of six olive cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 96, p. 235-247, 2002.
- CHEN, T. H. H.; MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 250-257, 2002.
- CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J. -K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**, v. 45, p. 437-448, 2005.
- 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 Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 289-297, 2003.
- CUI, S.; HUANG, F.; WANG, J.; MA, X.; CHENG, Y.; LIU, J. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. **Proteomics**, v. 5, p. 3162-3172, 2005.

CUSHMAN, J. C.; BOHNERT, H. J. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 117-124, 2000.

DAVIES, W. J.; ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 55-76, 1991.

DREW, M. C.; HOLE, P. C.; PICCHIONI, G. A. Inhibition by NaCl of net CO₂ fixation and yield of cucumber. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 115, p. 472-477, 1990.

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

EKER, S.; CÖMERTPAY, G.; KONUSKAN, O.; ÜLGER, A. C.; ÖZTÜRK, L.; ÇAKMAK, I. Effect of salinity stress on dry matter production and ion accumulation in hybrid maize varieties. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 30, p. 365-373, 2006.

FAO. 2005. *Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-affected Soils*. Rome, Italy: FAO Land and Plant Nutrition Management Service. <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush>

FELLE, H. H. The H⁺/Cl⁻ symporter in root hair cells of *Sinapis alba*. **Plant Physiology**, v. 106, p. 1131-1136, 1994.

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

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

FREIRE FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). In: ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E. E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAF, 1988. p. 25-46.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: EMBRAPA, 2005. p. 29-92.

GARG, N.; SINGLA, R. Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 137-146, 2004.

GAXIOLA, R.; LI, J.; UNDURRAGA, S., DANG, L. M.; ALLEN, G. J.; ALPER, S.; FINK, G. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. **PNAS**, v. 98, p. 11444-11449, 2001.

GEHLOT, H. S.; PUROHIT, A.; SHEKHAWAT, N. S. Metabolic changes and protein patterns associated with adaptation to salinity in *Sesamum indicum* cultivars. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 4, p. 31-39, 2005.

GLYNN, P.; FRASER, C.; GILLIAN, A. Foliar salt tolerance of Acer genotypes using chlorophyll fluorescence. **Journal of Arboriculture**, v. 29, p. 61-65, 2003.

GRATTAN, S. R.; GRIEVE, C. M. Salinity-mineral nutrient relation in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 127-157, 1999.

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

GUAZELLI, J. R. Histórico das pesquisas com caupi no Brasil. In: Araújo, J.P.P.; WATT, E.E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-CNPAP, 1988. p. 49-59.

HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. -K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463-499, 2000.

HENDRY, G. A. F.; PRICE, A. H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: Hendry, G. A. F. and Grime J. P. (Eds.) **Methods in comparative plant ecology**. London: Chapman & Hall, 1993, p.148-152.

HUANG, Z.; LONG, X. ; WANG, L. ; KANG, J.; ZHANG, Z.; ZED, R.; LIU, Z. Growth, photosynthesis and H⁺-ATPase activity in two Jerusalem artichoke varieties under NaCl-induced stress. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 591-596, 2012.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, v. 25, n. 06, p. 1-88, jun. 2012.

JIAO, D.; JI, B.; LI, X. characteristics of chlorophyll fluorescence and membrane-lipid peroxidation during senescence of flag leaf in different cultivars of rice. **Photosynthetica**, v. 41, p. 33-41, 2003.

JELLOULI, N.; JOUIRA, H. B.; SKOURI, H.; GHORBEL, A.; GOURGOURI, A.; MLIKI, A. Proteomic analysis of Tunisian grapevine cultivar Razegui under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 471-481, 2008.

KALAJI, H. M.; GOVINDJEE; BOSA, K.; KOSCIELNIAK, J.; ZUK-GOŁASZEWSKA, K. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO₂ assimilation of two Syrian barley landraces. **Environmental and Experimental Botany**, v. 73, p. 64-67, 2011.

KAV, N. N. V.; SRIVASTAVA, S.; GOONEWARDENE, L.; BLADE, S. F. Proteome-level changes in the roots of *Pisum sativum* in response to salinity. **Annals Applied Biology**, v. 145, p. 217-230, 2004.

KAWASAKI, S.; BORCHERT, C.; DEYHOLOS, M.; WANG, H.; BRAZILLE, S.; KAWAI, K.; GALBRAITH, D.; BOHNERT, H. J. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. **The Plant Cell**, v. 13, p. 889-905, 2001.

KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I. T.; RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1301-1322, 2011.

KOYRO, H. -W. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 136-146, 2006.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basic. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 313-349, 1991.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C.; KNAPP, M. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{Fd} of leaves with the PAM fluorometer. **Photosynthetica**, v. 43, p. 379-393, 2005.

LIU, J.; ZHU, J. -K. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 114, p. 591-596, 1997.

LORENZEN, I.; ABERLE, T.; PLIETH, C. Salt stress-induced chloride flux: a study using transgenic *Arabidopsis* expressing a fluorescent anion probe. **The Plant Journal**, v. 38, p. 539-544, 2004.

LORETO, F.; CENTRITTO, M.; CHARTZOULAKIS, K. Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 595-601, 2003.

LÜTTGE, U. Plant cell membranes and salinity: structural, biochemical and biophysics changes. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, p. 217-224, 1993.

MAATHUIS, F. J. M.; AMTMANN, A. K^+ nutrition and Na^+ toxicity: the basis of cellular K^+/Na^+ ratios. **Annals of Botany**, v. 84, p. 123-133, 1999.

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

MAJOUL, T.; CHAHED, K.; ZAMITI, E.; OUELHAZI, L.; GHRIR, R. Analysis by two-dimensional electrophoresis of the effect of salt stress on the polypeptide patterns in roots of a salt-tolerant and a salt-sensitive cultivar of wheat. **Electrophoresis**, v. 21, p. 2562-2565, 2000.

MANN, M.; JENSEN, O. N. Proteomic analysis of pos-translational modifications. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 255-261, 2003.

MANSOUR, M. M. F.; SALAMA, K. H. A.; AL-MUTAWA, M. M. Transport proteins and salt tolerance in plants. **Plant Science**, v. 164, p. 891-900, 2003.

MÄSER, P.; GIERTH, M.; SCHROEDER, J. I. Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. **Plant and Soil**, v. 247, p. 43-54, 2002.

MATEOS-NARANJO, E.; REDONDO-GÓMEZ, S.; ANDRADES-MORENO, L.; DAVY, A. J. Growth and photosynthetic responses of the cordgrass *Spartina maritima* to CO_2 enrichment and salinity. **Chemosphere**, v. 81, p. 725-731, 2010.

MOUGET, J.; TREMBLIN, G. Suitability of the fluorescence monitoring system (FM, Hansatech) for measurement of photosynthetic characteristics in algae. **Aquatic Botany**, v. 74, p. 219-231, 2002.

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

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, v. 167, p. 645-663, 2005.

MUÑOZ-MAYOR, A.; PINEDA, B.; GARCIA-ABELLÁN, J. O.; ANTÓN, T.; GARCIA-SOGO, B.; SANCHEZ-BEL, P.; FLORES, F. B.; ATARÉS, A.; ANGOSTO, T.; PINTOR-TORO, J. A.; MORENO, V.; BOLARIN, M. C. Overexpression of dehydrin *tas14* gene improves the osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 459-468, 2012.

MURILLO-AMADOR, B.; TROYO-DIEGUEZ, E.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, J. L.; LÓPEZ-AGUILAR, R.; ÁVILA-SERRANO, N. Y.; ZAMORA-SALGADO, S.; RUEDA-PUENTE, E. O.; KAYA, C. Effect of NaCl salinity in the genotypic variation of cowpea (*Vigna unguiculata*) during early vegetative growth. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, p. 423-431, 2006.

NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 388-395, 2002.

NG, N. Q.; MARÉCHAL, R. Cowpea taxonomy, origin germplasm. In: SINGH, S. R.; RACHIE, K. O. (Eds.). **Cowpea research, production and utilization**. Chichester: John Wiley e Son, 1985. v. 19. p.11-21.

NIU, X.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. **Plant Physiology**, v. 109, p. 735-742, 1995.

NIU, X.; NARASIMHAN, M. L.; SALZMAN, R. A.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. NaCl regulation of plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. **Plant Physiology**, v. 103, p. 713-718, 1993.

OUERGHI, Z.; RÉMY, R.; OUELHAZI, L.; AYADI, A.; BRULFERT, J. Two-dimensional electrophoresis of soluble leaf proteins, isolated from two wheat species (*Triticum durum* and *Triticum aestivum*) differing in sensitivity towards NaCl. **Electrophoresis**, v. 21, p. 2487-2491, 2000.

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin taxonomy and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B .B.; MOHAN, R.; DASHIELL, K. E; JACKAI, L. E. N.,(Eds). **Advances in Cowpea Research**. Tsukuba: IITA JIRCAS, 1997. p.1-12.

PANG, Q.; CHEN, S.; DAI, S.; CHEN, Y.; WANG, Y.; YAN, X. Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 2584-2599, 2010.

PARDO, J. M.; QUINTERO, F. J. Plants and sodium ions: keeping company with the enemy. 2002. Disponível em: <http://genomebiology.com/2002/3/6/reviews/1017.1>.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B.; MITTRA, B. Effects of NaCl stress on the structure, pigment complex composition and photosynthetic activity of mangrove *Bruguiera parviflora* chloroplasts. **Photosynthetica**, v. 41, p. 191-200, 2003.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B.; MITTRA, B. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. **Trees**, v. 18, p. 167-174, 2004.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324-349, 2005.

PERCIVAL, G. C.; FRASER, G. A. Measurement of the salinity and freezing tolerance of *Crataegus* genotypes using chlorophyll fluorescence. **Journal Arboriculture**, v. 27, p. 233-245, 2001.

PEREIRA, W. E. **Trocas gasosas, fluorescência da clorofila, crescimento e composição mineral de quatro porta-enxertos de citros submetidos a estresse por alumínio, em cultivo hidropônico**. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

PESTANA, M.; DAVID, M.; DE-VARENNES A.; ABADIA, J.; FARIA, E. A. Responses of "Newhall" orange trees to iron deficiency in hydroponics: effects on leaf chlorophyll, photosynthetic efficiency, and root ferric chelate reductase activity. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, p. 1609-1620, 2001.

PHILLIPS, R. D.; MCWATTERS, K. H.; CHINNAN, M. S.; HUNG, Y.; BEUCHAT, L. R.; SEFA-DEDEH, S.; SAKYI-DAWSON, E.; NGODDY, P.; NNANYELUGO, D.; ENWERE, J.; KOMEY, N. S.; LIU, K.; MENSA-WILMOT, Y.; NNANNA, I. A.; OKEKE, C.; PRINYAWIWATKUL, W.; SAALIA, F. K. Utilization of cowpea for human food. **Field Crops Research**, v. 82, p. 193-213, 2003.

PRAXEDES, S. C.; LACERDA, C. F.; DAMATTA, F. M.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Salt tolerance is associated with differences in ion accumulation, biomass allocation and photosynthesis in cowpea cultivars. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 196, p. 193-204, 2010.

PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: Gheyi, H. R.; Dias, N. S.; Lacerda, C. F. (eds.). **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCT Sal, 2010, p. 143-159.

RABHI, M.; GIUNTINI, D.; CASTAGNA, A.; REMORINI, D.; BALDAN, B.; SMAOUI, A.; ABDELLY, C.; RANIERI, A. *Sesuvium portulacastrum* maintains adequate gas exchange, pigment composition, and thylakoid proteins under moderate and high salinity. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 1336-1341, 2010.

RAMPITSCH, C.; SRINIVASAN, M. The application of proteomics to plant biology: a review. **Canadian Journal of Botany**, v. 84, p. 883-892, 2006.

REA, P. A.; SANDERS, D. Tonoplast energization: 2 H⁺ pumps, one membrane. **Physiologia Plantarum**, v. 71, p. 131-141, 1987.

REJILI, M.; VADEL, A. M.; GUETET, A.; NEFFATTI, M. Effect of NaCl on the growth and the ionic balance K⁺/Na⁺ of two populations of *Lotus creticus* (L.) (Papilionaceae). **South African Journal of Botany**, v. 73, p. 623-631, 2007.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, A.; RUBIO, F. High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 1149-1160, 2006.

ROMERO-ARANDA, R.; SORIA, T.; CUARTERO, J. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. **Plant Science**, v. 160, p. 265-272, 2001.

SAIRAM, R. K.; TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, v. 86, p. 407-421, 2004.

SALAMA, K. H. A.; MANSOUR, M. M. F.; ALI, F. Z. M.; ABOU-HADID, A. F. NaCl-induced changes in plasma membrane lipids and proteins of *Zea mays* L. cultivars differing in their response to salinity. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 29, p. 351-359, 2007.

SALEKDEH, G. H.; SIOPONGCO, J.; WADE, L. J.; GHAREYAZIE, B.; BENNETT, J. A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. **Field Crops Research**, v. 76, p. 199-219, 2002.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; TAJI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNINCI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, v. 31, p. 279-292, 2002.

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

SHA VALLI KHAN, P. S.; HOFFMANN, L.; RENAUT, J.; HAUSMAN, J. F. Current initiatives in proteomics for the analysis of plant salt tolerance. **Current Science**, v. 93, p. 807-817, 2007.

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

SHEVCHENKO, A.; SUNYAEV, S.; LOBODA, A.; SHEVCHENKO, A.; BORK, P.; ENS, W.; STANDING, K. Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 1917-1926, 2001.

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

- SILVA, J. V.; LACERDA, C. F.; COSTA, P. H. A.; ENÉAS FILHO, J.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T. Physiological responses of NaCl stressed cowpea plants grown in nutrient solution supplemented with CaCl₂. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 99-105, 2003.
- SILVEIRA, J. A. G.; MELO, A. R. B.; VIÉGAS, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, p. 171-179, 2001.
- SKERRETT, M.; TYERMANN, S. D. A channel that allows inwardly directed fluxes of anions in protoplasts derived from wheat roots. **Planta**, v. 192, p. 295-305, 1994.
- SMIRNOFF, N. Plant resistance to environmental stress. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, p. 214-219, 1998.
- SOUZA, M. F.; CAMPOS, F. A. P.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; GOMES-FILHO, E. Growth and protein pattern in cowpea seedlings subjected to salinity. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 341-346, 2003.
- STEELE, W. M.; MEHRA, K. L. Structure, evolution and adaptation to farming system and environment in *Vigna*. In: SUMMERFIELD, D. R.; BUNTING, A. H. (Eds.). **Advances in legume science**. England: Royal Botanic Gardens, 1980.
- SZABOLCS, I. Soil salinization. In: Pessarakli, M. (ed.) **Handbook of plant and crop stress**. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 3-11, 1994.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- TAYLOR, N. L.; TAN, Y. -F.; JACOBY, R. P.; MILLAR, A. H. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisomes proteomes. **Journal of proteomics**, v. 72, p. 367-378, 2009.
- TEIXEIRA, S. M.; MAY, P. H.; SANTANA, A. C. Produção e importância econômica do caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-CNPAP, 1988. p. 101-136.
- TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. **Annals of Botany**, v. 91, p. 503-527, 2003.

TYERMANN, S. D.; SKERRETT, I. M. Root ion channels and salinity. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 175-235, 1999.

URAO, T.; YAKUBOV, B.; SATOH, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M.; HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. **The Plant Cell**, v. 11, p. 1743-1754, 1999.

USDA-ARS. 2008. Research databases. Bibliography on salt tolerance. *George E. Brown, Jr. Salinity Lab. US Dep. Agric. Res. Serv. Riverside, CA.*
<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8908>

VEERANAGAMALLAIAH, G.; JYOTHSNAKUMARI, G.; THIPPESWAMY, M.; CHANDRA OBUL REDDY, P.; SURABHI, G. -K.; SRIRANGANAYAKULU, G.; MAHESH, Y.; RAJASEKHAR, B.; MADHURAREKHA, Ch.; SUDHAKAR, C. Proteomic analysis of salt stress responses in foxtail millet (*Setaria italica* L. cv. Prasad) seedlings. **Plant Science**, v. 175, p. 631-641, 2008.

VINCENT, D.; ERGÜL, A.; BOHLMAN, M. C.; TATTERSALL, E. A. R.; TILLET, R. L.; WHEATLEY, M. D.; WOOLSEY, R.; QUILICI, D. R.; JOETS, J.; SCHLAUCH, K.; SCHOOLEY, D. A.; CUSHMAN, J. C.; CRAMER, G. R. Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 1873-1892, 2007.

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

WANG, H.; QI, Q.; SCHORR, P.; CUTLER, A. J.; CROSBY, W. L.; FOWKE, L. C. ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. **Plant Journal**, v. 15, p. 501-510, 1998.

WESTERMEIER, R.; LOYLAND, S.; ASBURY, R. Proteomics technology. **Journal of Clinical Ligand Assay**, v. 25, p. 1-11, 2002.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHRY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 19-50, 1996.

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

XUE, Z. -Y.; ZHI, D. -Y.; XUE, G. -P.; ZHANG, H.; ZHAO, Y. -X.; XIA, G. -M. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺. **Plant Science**, v. 167, p. 849-859, 2004.

YAMAGUCHI, T.; BLUMWALD, E. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 615-620, 2005.

YAN, W.; AEBERSOLD, R.; RAINES, E. W. Evolution of organelle-associated protein profiling. **Journal of proteomics**, v. 72, p. 4-11, 2009.

YEO, A. R.; Salinity resistance: physiologies and prices. **Physiologia Plantarum**, v. 58, p. 214-222, 1983.

YEO, A. R.; FLOWERS, S. A.; RAO, G.; WELFARE, K.; SENANAYAKE, N.; FLOWERS, T. J. Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oriza sativa* L.) in saline conditions and this is accounted for by a reduction in the transpirational by pass flow. **Plant Cell and Environment**, v. 22, p. 559-565, 1999.

ZHANG, H. -X.; BLUMWALD, E. Transgenic salt-tolerance tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 765-768, 2001.

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

ZHU, J. -K. Cell signaling under salt, water and cold stresses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 401-406, 2001b.

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

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

Experimento - 1

***ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE PLANTAS DE FEIJÃO DE
CORDA SUBMETIDAS A CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE NaCl***

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE PLANTAS DE FEIJÃO DE CORDA SUBMETIDAS A CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE NaCl

1. INTRODUÇÃO

O excesso de sais no solo inibe o crescimento da maioria das espécies vegetais, limitando a produtividade agrícola. Os efeitos da salinidade sobre as plantas são consequência de fatores osmóticos e iônicos (MUNNS, 2005). O componente osmótico resulta das elevadas concentrações de sais dissolvidos na solução do solo, os quais reduzem o potencial osmótico dessa solução, diminuindo, conseqüentemente, a disponibilidade da água para a planta. O efeito iônico, por outro lado, refere-se aos íons absorvidos pelas plantas, os quais podem provocar um desequilíbrio iônico e/ou efeitos tóxicos para o metabolismo da planta.

O estresse salino induz uma série de respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que dependem de processos moleculares (HUSSAIN *et al.*, 2010). Vários trabalhos com plantas submetidas à salinidade relatam o aumento dos níveis de íons tóxicos nos tecidos, com inibição da absorção de nutrientes essenciais e da fotossíntese (KAO *et al.*, 2006; KEUTGEN; PAWELZIK, 2009; PARIDA; DAS, 2005). Por outro lado, é comum a síntese de solutos compatíveis, tais como a prolina, carboidratos e compostos de amônio quaternário, os quais contribuem para o ajustamento osmótico em condições de salinidade, garantindo o fluxo contínuo de água no sistema solo/planta/atmosfera (ASHRAF; HARRIS, 2004).

As adaptações ao estresse salino requerem alterações na maquinaria celular que resultam diretamente de modificações na expressão gênica. Isto tem sido verificado em muitos estudos onde a salinidade alterou os níveis (aumento ou diminuição) e a presença (aparecimento ou desaparecimento) de algumas proteínas celulares. Em trigo (*Triticum durum* L.), por exemplo, Caruso *et al.* (2008) observaram 38 proteínas cujos níveis foram alterados

quando as plantas foram submetidas à salinidade de 100 mM de NaCl. Em videira (*Vitis vinifera*), 48 proteínas mostraram diferenças na expressão, com 32 aumentando e 9 diminuindo de intensidade, e 7 novas proteínas induzidas sob condições de estresse salino (JELLOULI *et al.*, 2008).

O perfil de expressão global de proteínas tem sido investigado e comparado por meio de técnicas como a eletroforese bidimensional (2D), a qual permite a resolução de um grande número de polipeptídeos a partir de uma mistura complexa de proteínas. Este é o método de escolha em muitas pesquisas que avaliam os produtos gênicos em plantas submetidas a vários tipos de estresse abiótico, incluindo o salino (DEEBA *et al.*, 2012; MAJOUL *et al.*, 2000; ZANG; KOMATSU, 2007; VICENT *et al.*, 2007).

O feijão de corda (*Vigna unguiculata*) é uma cultura de grande importância na produção agrícola brasileira, cultivado predominantemente no semi-árido da região Nordeste e em pequenas áreas na Amazônia, servindo de alimento básico para a população devido ao alto valor nutricional (TEIXEIRA *et al.*, 1988). Este trabalho teve por objetivo caracterizar algumas das respostas fisiológicas e bioquímicas de cultivares de feijão de corda com tolerância diferencial à salinidade, bem como avaliar as alterações nos perfis de expressão de proteínas em decorrência da aplicação de concentrações crescentes de sal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Material vegetal e condições experimentais

Neste experimento foram utilizados dois cultivares de feijão de corda (*V. unguiculata*), um tolerante (Pitiúba) e outro sensível (TVu 2331) à salinidade (COSTA *et al.*, 2003; PRAXEDES *et al.*, 2010), cujas sementes foram fornecidas pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Após esterilização superficial com NaOCl a 1% (v/v), por 5 min, e lavagens com água destilada, as sementes de ambos os cultivares foram

semeadas em copos plásticos contendo vermiculita sob condições de casa de vegetação. Aos cinco dias após a semeadura, plântulas de tamanho uniforme foram transferidas para recipientes plásticos contendo 10 L de solução nutritiva de Hoagland diluída 1:2. Após três dias de aclimatação, as plantas foram transferidas para vasos de 6 L (duas plantas por vaso) com a mesma solução nutritiva, mas na sua concentração completa. Vinte quatro horas após essa transferência, os tratamentos salinos foram iniciados com a adição de NaCl à taxa de 25 mM por dia de modo a atingir as concentrações desejadas (50, 75 e 100 mM de NaCl). As plantas mantidas em solução nutritiva na ausência de NaCl constituíram o tratamento controle. As soluções nutritivas foram aeradas constantemente e seus níveis mantidos pela adição diária de água destilada. As trocas de soluções foram efetuadas a cada cinco dias para evitar restrições de nutrientes. O pH da solução nutritiva foi monitorado diariamente, e seu valor ajustado para 5,0-5,5 com NaOH a 0,1 M ou HCl a 0,1 M. Durante o período experimental, os valores médios de temperatura e umidade relativa do ar, no interior da casa de vegetação, registrados com um termohigrógrafo, foram de $28,7 \pm 0,9$ °C e $64,3 \pm 3,5\%$, respectivamente. A radiação fotossinteticamente ativa média na casa de vegetação, ao meio-dia, foi de $1500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

2.2- Coleta das plantas e medidas de crescimento

A coleta do material vegetal foi realizada aos 15 dias após o início dos tratamentos salinos. As plantas foram divididas em folhas, caules e raízes, sendo a área foliar (AF) obtida com um medidor de área (LI-3100, Li-COR, Inc., Lincoln, NE, USA). Amostras de folhas (2ª e 3ª folhas completamente expandidas, a contar do ápice do ramo principal) e de raízes (terço médio) foram separadas, congeladas em N₂ líquido e liofilizadas para serem utilizadas nas análises bioquímicas (solutos orgânicos e obtenção dos padrões protéicos bidimensionais). O restante do material foi colocado em estufa a 60 °C até atingir massa constante. Com essas

medidas, foram estimadas as matérias secas das partes das plantas e, portanto, a relação de matéria seca das raízes pela da parte aérea (MSR/MSPA).

2.3- Determinação do teor relativo de água

O teor relativo de água (TRA) foi determinado como descrito por Catský (1960). Das primeiras folhas completamente expandidas, de cada planta no vaso, foram retirados 5 discos de 1 cm de diâmetro. Após pesagem e obtenção da massa fresca (MF), os discos foliares permaneceram em água destilada por 3 h até atingirem a massa túrgida (MT). Em seguida, os discos foram colocados em estufa a 60 °C durante 72 h, para obtenção da massa seca (MS). Os dados obtidos foram inseridos na fórmula: $TRA (\%) = [(MF-MS) / (MT-MS)] \times 100$.

2.4- Teor relativo de clorofila, medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila

Os teores relativos de clorofila total foram determinados aos 10 dias após o início dos tratamentos salinos com o auxílio de um medidor portátil (SPAD 502, Minolta Co., Ltd, Osaka, Japan), sendo os resultados expressos em unidades de leitura do aparelho. Os parâmetros de trocas gasosas (fotossíntese líquida, transpiração, condutância estomática e concentração interna de CO₂) e de fluorescência da clorofila foram determinados no dia anterior à coleta, entre 8:00 e 11:00 h, com um analisador portátil de gás no infravermelho (mod. Li-6400XT, Li-COR, NE, USA) acoplado a uma câmara de fluorescência (mod. 6400-40, Li-COR, NE, USA). A intensidade luminosa utilizada nas medições de trocas gasosas foi de 1.000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, enquanto que para as medidas de fluorescência da clorofila utilizou-se uma intensidade de 3.000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Com as folhas na presença de luz, foram determinados os parâmetros de fluorescência do estado adaptado à luz: qP ("quenching" fotoquímico), NPQ ("quenching" não-fotoquímico) e Φ PSII (eficiência fotoquímica efetiva do fotossistema 2). As leituras de fluorescência variável (Fv) e máxima (Fm) foram determinadas em folhas

adaptadas ao escuro por 30 min e utilizadas para o cálculo da eficiência fotoquímica potencial do PS2, expressa pela relação F_v/F_m . Todas as medições foram realizadas na 2ª folha completamente expandida de cada planta em condições ambientais de temperatura e umidade do ar.

2.5- Determinação dos teores de solutos inorgânicos

2.5.1. Obtenção dos extratos

Para a preparação dos extratos utilizou-se o método descrito por Cataldo *et al.* (1975), que consistiu na homogeneização de 100 mg da matéria seca de tecidos de folhas e raízes, previamente triturado e convertido a pó, com 10 ml de água desionizada durante 1 h em banho-maria a 40 °C. Os tubos contendo o homogenato foram agitados vigorosamente a cada 15 min e, em seguida, centrifugados a 3.000 x g por 10 min. O sobrenadante obtido foi filtrado em papel de filtro e armazenado a -25 °C.

2.5.2. Teores de sódio, potássio e cloreto

Os teores de sódio e potássio foram determinados por fotometria de chama, segundo metodologia descrita por Malavolta *et al.* (1989). Foram realizadas análises com os extratos convenientemente diluídos, sendo feitas duas leituras no fotômetro de chama para cada repetição. Os teores de cloreto foram determinados usando-se 3,0 mL do extrato convenientemente diluído, adicionados de 0,5 mL do reagente formado pela mistura de $Hg(SCN)_2$ a 13,2 mM, em metanol, com $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ a 20,2% (v/v), em água desionizada, na proporção de 4:1. Após agitação vigorosa, os tubos permaneceram em repouso durante 15 min e, em seguida, a leitura foi realizada a uma absorvância de 460 nm. Os teores de cloreto foram estimados por meio de uma curva de calibração, utilizando-se NaCl como padrão

(GAINES; PARKER; GASCHO, 1984). Cada extrato e suas repetições foram dosados em duplicata. Os teores de solutos inorgânicos foram expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS.

2.6- Determinação dos teores de solutos orgânicos

2.6.1. Obtenção dos extratos

Os extratos para determinação dos solutos orgânicos foram obtidos pela homogeneização de 100 mg do pó liofilizado de folhas e raízes com 10 ml de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,5, com NaCl a 0,1 M. O homogenato resultante permaneceu em agitação por 30 min e, em seguida, foi centrifugado a 3.000 x g por 10 min. O sobrenadante obtido foi filtrado em papel de filtro e armazenado a -25 °C.

2.6.2. Carboidratos solúveis

Os teores de carboidratos solúveis foram determinados de acordo com o método de Dubois *et al.* (1956). Em alíquotas de 0,5 mL dos extratos convenientemente diluídos, foram adicionados 0,5 mL de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico. Após agitação vigorosa, os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 15 min para o seu resfriamento. Em seguida, as amostras foram submetidas à leitura de absorbância em 490 nm. Os teores de carboidratos solúveis foram estimados por meio de uma curva padrão de glicose D(+) anidra. Cada extrato e suas repetições foram dosados em duplicata, sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS.

2.6.3. N-aminossolúveis

Os teores de N-aminossolúveis foram determinados de acordo com o método de Yemm e Cocking (1955). Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL dos extratos convenientemente diluídos, 0,25 mL de tampão citrato a 0,2 M (pH 5,0), 0,5 mL de KCN a

0,2 mM em metilcelosolve e 0,1 mL de ninhidrina a 5% em metilcelosolve. Em seguida, os tubos foram fechados, agitados vigorosamente e colocados em banho-maria por 20 min a 100 °C. A reação foi interrompida abruptamente colocando-se os tubos em banho de gelo e, após o resfriamento, foram adicionados 0,65 mL de etanol a 60%. Os teores de N-aminossolúveis foram estimados através de leituras de absorvância em 570 nm, tendo como referência uma curva padrão de glicina. Cada extrato e suas repetições foram dosados em duplicata, sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS.

2.6.4. Prolina livre

Os teores de prolina foram determinados de acordo com o método de Bates, Waldren e Teare (1973). Em tubos de ensaio contendo 1 mL do extrato convenientemente diluído, foram adicionados 1 mL de ninhidrina ácida e 1 mL de ácido acético glacial. Para um total de 50 amostras, o reagente da ninhidrina ácida foi preparado dissolvendo-se 1,25 g de ninhidrina em 30 mL de ácido acético e 20 mL de ácido fosfórico a 6 M. Em seguida, os tubos foram fechados com tampas rosqueáveis, agitados vigorosamente e colocados em banho-maria por 1 h a 100 °C. A reação foi interrompida colocando-se os tubos em banho de gelo. Após o resfriamento, foram adicionados 2,0 mL de tolueno ao meio de reação. Em seguida, os tubos foram agitados vigorosamente e a fase superior menos densa (cromóforo + tolueno) foi aspirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur para posterior leitura de absorvância em 520 nm. Os teores de prolina foram estimados tendo como referência uma curva padrão de prolina e utilizando-se o tolueno como branco. Cada extrato e suas repetições foram dosados em duplicata, sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS.

2.7- Padrões eletroforéticos bidimensionais

2.7.1. Extração das proteínas totais

Amostras de tecido liofilizado de folhas foram finamente trituradas, com o auxílio de almofariz e pistilo até adquirirem o aspecto de farinha, e utilizadas para a extração das proteínas, segundo o método descrito por Shen *et al.* (2002). Cerca de 200 mg do tecido vegetal liofilizado foram homogeneizados, juntamente com 200 mg de polivinilpirrolidona (PVPP), em 5,0 mL de tampão Tris-HCl a 40 mM, pH 7,5, contendo sacarose a 250 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10 mM, Triton X-100 a 1%, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) a 1,0 mM e ditioneitol (DTT) a 1,0 mM. A mistura foi agitada por 1 h a 4 °C e, em seguida, centrifugada a 15.000 x g por 15 min a 4 °C. Para precipitação das proteínas, ao sobrenadante foram adicionados 10 mL de TCA a 10%, em acetona gelada, sendo a mistura, após homogeneização, deixada em repouso por uma noite a -20 °C. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 15.000 x g por 15 min, sendo o precipitado submetido a lavagens com acetona gelada. O precipitado foi seco a vácuo e utilizado nas eletroforeses bidimensionais.

2.7.2. Dosagem de proteínas

O método de Bradford (1976) foi empregado para determinar a quantidade de proteínas obtida do processo de extração e estimar a quantidade de proteínas a ser utilizada nas eletroforeses. À 100 µL da amostra, convenientemente diluída, foi adicionado 1,0 mL de uma solução de Coomassie Blue G-250 a 0,01% contendo etanol a 4,75% e ácido fosfórico a 8,5%. A mistura foi deixada em repouso por 15 min e, em seguida, submetida a leituras de absorvância em 595 nm. Albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, USA) foi utilizada como padrão na curva de calibração.

2.7.3. Eletroforese bidimensional e revelação dos spots

As amostras protéicas foram solubilizadas em 300 µL de uma solução contendo uréia a 7 M, tiouréia a 2 M, CHAPS a 2% (m/v), IPG buffer 3-10 a 2% (v/v) e DTT a 0,3% (m/v), como descrito previamente por Rabilloud *et al.* (1997). As proteínas foram solubilizadas por um período mínimo de 1 h, à temperatura ambiente, com agitações vigorosas ocasionais, e centrifugadas a 12.000 x g por 10 min. Posteriormente, com base nos resultados de dosagens das proteínas, volumes apropriados da amostra (sobrenadante) contendo aproximadamente 400 µg de proteínas foram diluídos em solução de reidratação [uréia a 8 M, CHAPS a 2% (m/v), IPG buffer 3-10 a 2% (v/v), DTT a 0,3% e azul de bromofenol a 0,002% (m/v)] para um volume final de 0,25 mL e aplicados em uma bandeja de reidratação (*Reswelling Tray*, Pharmacia Biotech). Em seguida, tiras de gel com gradiente de pH imobilizado (*Immobiline DryStrip*, pH 4-7, GE-Healthcare) foram deixadas em contato com a mistura na bandeja durante a noite, à temperatura ambiente.

A focalização isoeétrica foi realizada no equipamento Multiphor II (Pharmacia Biotech), à temperatura constante de 20 °C, com o auxílio da fonte EPS 3501 XL (GE-Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. A corrida foi realizada em três fases no módulo gradiente. A voltagem foi inicialmente aumentada para 300 V durante 5 min, em seguida, aumentada lentamente para 3500 V por 1:30 h e finalmente mantida em 3500 V por 4:10 h. Após a focalização, as tiras foram equilibradas sob agitação em solução de equilíbrio (Tris-HCl a 50 mM, pH 8,8, uréia a 6 M, glicerol a 30%, SDS a 2% e azul de bromofenol) com DTT a 1% (m/v) por 15 min e, em seguida, por 15 min com iodoacetamida a 2,5% (m/v). Terminado o equilíbrio, as tiras foram fixadas no topo de géis de poliacrilamida na concentração de 12,5% (16 x 18 cm) e seladas com uma solução de agarose a 0,5% e azul de bromofenol a 0,002% (m/v). A segunda dimensão foi realizada na unidade de eletroforese vertical SE 600 Ruby (GE-Healthcare), sendo o sistema alimentado pela fonte EPS 3501 XL.

Para cada gel, foi aplicada uma corrente constante de 15 mA durante 30 min e, em seguida, uma corrente de 25 mA até o azul de bromofenol atingir o final do gel. Juntamente com a amostra, foi aplicada uma mistura de proteínas com massas moleculares conhecidas (MW Marker Kit Range: 14.000-70.000, Sigma-Aldrich, USA).

Depois de fixadas no gel com uma solução de ácido acético a 10% (v/v) e etanol a 40% (v/v), as proteínas separadas foram coradas com solução de Coomassie Blue G-250 coloidal a 0,1% (m/v) (NEUHOFF *et al.*, 1988). Os géis foram escaneados utilizando-se o programa LabScan v. 5.0 (GE-Healthcare) no ImageScanner (Amersham Biosciences) e as imagens obtidas analisadas no programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE-Healthcare). Através deste programa foram estimados os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada “spot”.

2.7.4. Análise das imagens

Para a comparação dos géis utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum, as imagens dos géis obtidos foram previamente padronizadas com o intuito de minimizar distorções nas análises. Nas configurações de exibição dos géis determinou-se a escala de cinza, formato TIFF com resolução de 300 dpi. A detecção dos “spots” foi realizada com subtração do fundo e detecção automática (contraste de 30%, área mínima de 70% e saliência de 200), seguida de correções manuais. Os géis bidimensionais dos cultivares Pitiúba e TVu de feijão de corda foram comparados da seguinte forma: os “spots” das triplicatas dos géis do tratamento controle foram comparados entre si, assim como os “spots” das triplicatas dos géis dos tratamentos salinos (NaCl a 50, 75 e 100 mM). Um total de 12 géis para cada cultivar foram comparados entre si. Nas comparações, os géis tiveram seus spots iguais ligados por meio de “landmarks” e identificados numericamente. Em seguida, os valores de volumes gerados pelo programa para cada “spot” foram usados para os cálculos de correlação. O gel

que possuiu o coeficiente de correlação que mais assemelhava entre os outros dois géis foi escolhido para a comparação com o gel do outro tratamento. Os valores de intensidade relativa foram utilizados para determinar as variações na expressão dos “spots” protéicos, sendo estas consideradas válidas para “spots” com aumento ou diminuição nos valores de intensidade de pelo menos duas vezes.

2.8- Delineamento experimental

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado com um arranjo fatorial 2 x 4, correspondendo a dois cultivares (Pitiúba e TVu) e quatro níveis de salinidade (controle, NaCl a 50, 75 e 100 mM) com cinco repetições, totalizando 40 parcelas experimentais. A parcela experimental foi constituída por um vaso contendo duas plantas cada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Crescimento das plantas

Com o aumento da salinidade no meio de crescimento, observou-se um decréscimo na área foliar de ambos os cultivares de feijão de corda. A área foliar das plantas submetidas ao tratamento com NaCl a 100 mM sofreu reduções de 48% no cultivar Pitiúba e 73% no cultivar TVu, quando comparadas com os tratamentos controles (Figura 1A). Estas reduções afetaram, conseqüentemente, a produção de biomassa pela planta por diminuir a área foliar disponível para a fotossíntese (PARIDA; DAS; MITTRA, 2004). Munns (2002) relata que a redução no crescimento foliar das plantas submetidas à salinidade deve-se, inicialmente, aos efeitos osmóticos da aplicação do sal, que provocam efeitos similares àqueles observados em plantas sob estresse hídrico. Contudo, o acúmulo excessivo de íons tóxicos nas folhas, excedendo a capacidade das células para compartimentalizar os sais no vacúolo, parece ser o fator

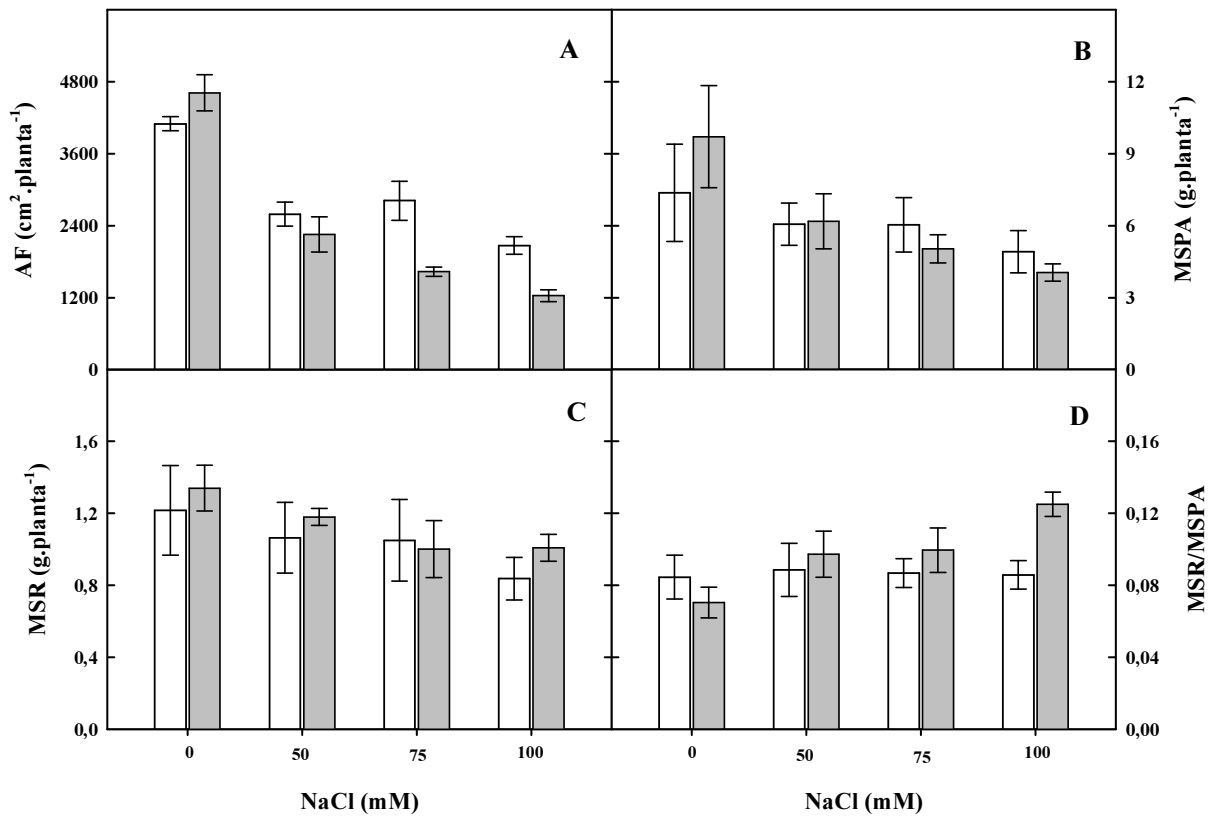


Figura 1. Área foliar (AF, A), matérias secas da parte aérea (MSPA, B), das raízes (MSR, C) e relação MSR/MSPA (D) de plantas de feijão de corda, cultivares Pitiúba (□) e TVu (■), submetidas a níveis crescentes de salinidade (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM). As barras representam o desvio padrão.

preponderante de inibição da expansão foliar em condições de estresse salino de longa duração.

A produção da matéria seca da parte aérea diminuiu com o aumento da salinidade de 0 mM até 100 mM de NaCl, sendo o cultivar TVu o mais afetado, com redução de 58%, enquanto o cultivar Pitiúba apresentou redução de 33% na maior concentração de sal (Figura 1B). Por outro lado, não houve diferença entre os cultivares com relação aos efeitos da salinidade sobre a matéria seca das raízes (Figura 1C). Vários autores têm mostrado o efeito inibitório do estresse salino na produção de biomassa tanto de folhas como de raízes (GHOULAM; FOURSY; FARES, 2002; HAJLAOUI *et al.*, 2010; M'RAH *et al.*, 2006). Guimarães *et al.* (2012), trabalhando com plantas de feijão de corda cultivar Pitiúba, observou uma redução na matéria seca da raiz em torno de 68%. Em plantas de *Lotus creticus*, Rejili *et al.* (2007) observaram reduções no crescimento quando a salinidade foi aumentada de 0 a 400 mM de NaCl, sendo este efeito relacionado com o desequilíbrio nas relações iônicas das plantas.

Com relação à razão MSR/MSPA, os dados obtidos mostraram que o decréscimo mais acentuado na MSPA, quando comparado ao da MSR, resultou em um aumento de 78% nesse parâmetro do cultivar TVu com o aumento do estresse salino até 100 mM (Figura 1D). No cultivar Pitiúba não houve alterações significativas. As alterações na distribuição percentual da matéria seca provocadas pelo estresse salino são condizentes com o fato de que a salinidade, além de reduzir a produção de biomassa pode também alterar a partição de fotoassimilados entre as diferentes partes das plantas (SILVA *et al.*, 2003). Em parte, os efeitos negativos da salinidade sobre o crescimento das plantas estão associados com alterações em processos fisiológicos essenciais, tais como as taxas de assimilação de CO₂.

Em geral, as medidas de crescimento confirmam a tolerância diferencial à salinidade existente entre os dois cultivares de feijão de corda, mostrando que o estresse salino imposto

foi mais severo para o cultivar TVu, como observado por Costa *et al.* (2003) e Praxedes *et al.* (2010), sendo a parte aérea mais afetada do que as raízes.

3.2- Teor relativo de água

Ao final do experimento, as plantas controle de ambos cultivares apresentaram um teor relativo de água (TRA) foliar médio de 85%. O estresse salino diminuiu o TRA das plantas em relação ao controle, com valor médio de 77% nos tratamentos a 75 e 100 mM de NaCl, sem diferenças entre os cultivares (Figura 2). Resultados semelhantes foram obtidos por Praxedes (2008), utilizando os mesmos cultivares de feijão submetidos à salinidade de NaCl a 75 mM. Em plantas de *Acacia nilotica*, o TRA nas folhas foram de 89, 84, 82 e 74%, para os níveis de sais de 0, 75, 100 e 200 mM de NaCl, respectivamente (NABIL; COUDRET, 1995). Esta sensível redução deveu-se, segundo os autores, possivelmente, ao ajustamento osmótico da planta em altos níveis de salinidade.

3.3- Teor relativo de clorofila

Os teores relativos de clorofila mostraram uma tendência de aumento em ambos os cultivares com o estresse salino. Em relação às plantas controle, o teor de clorofila aumentou 27% no Pitiúba e 19% no TVu, quando submetidos à dose de 100 mM de NaCl (Figura 3). Em geral, as plantas quando submetidas a estresses abióticos apresentam reduções no conteúdo de clorofila (DEBOUBA *et al.*, 2006; M'RAH *et al.*, 2006; PANDA; UPADHYAY; UPADHYAYA, 2006). No entanto, também pode ocorrer aumento nos teores de clorofilas, dependendo do nível de sal ao qual a planta é exposta (MA *et al.*, 1997). Praxedes (2008), também observou aumento nos teores de clorofila quando submeteu plantas de feijão de corda do cultivar Pitiúba ao estresse salino (NaCl a 75 mM), porém, no cultivar TVu não foram verificados grandes alterações em relações às plantas sob condições controle.

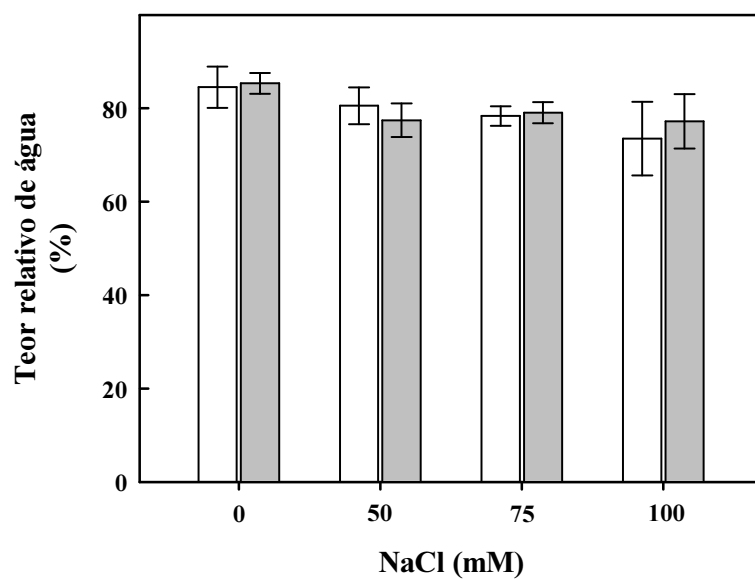


Figura 2. Teor relativo de água (TRA) em folhas de plantas de feijão de corda, cultivares Pitiúba (□) e TVu (■), submetidas a níveis crescentes de salinidade (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM). As barras representam o desvio padrão.

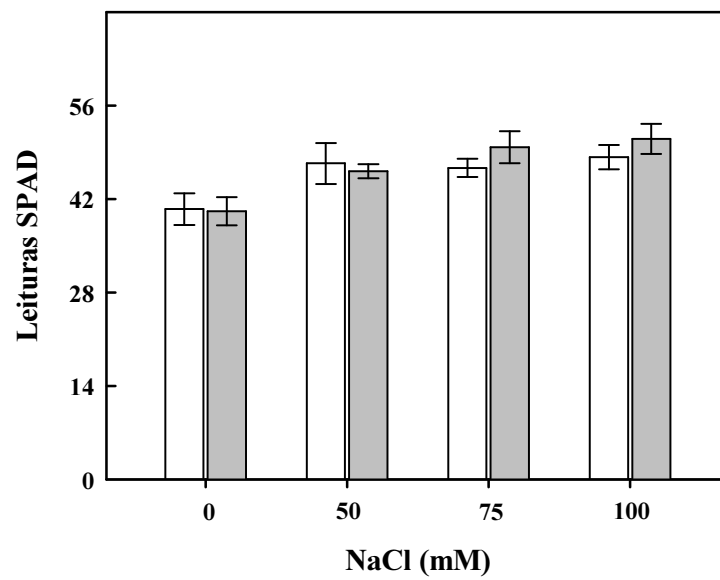


Figura 3. Teores clorofila, medidos com o medidor portátil SPAD-502, em plantas de feijão de corda cultivares Pitiúba (□) e TVu (■), submetidas a níveis crescentes de salinidade (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM). As barras representam o desvio padrão.

3.4- Fluorescência da clorofila

Com relação à eficiência fotoquímica potencial do fotossistema 2, não houve qualquer diferença significativa na razão entre a fluorescência variável e a fluorescência máxima da clorofila (F_v/F_m) de ambos os cultivares, quando comparadas plantas controles e estressadas (Figura 4A). Essa relação tem sido utilizada para detectar perturbações no sistema fotossintético causada pelo estresse salino, visto que sua diminuição indica um declínio na eficiência fotoquímica do PS2 e um distúrbio ou dano no aparato fotossintético (GLYNN; FRASER; GILLIAN, 2003; PERCIVAL; FRASER, 2001). Já a eficiência fotoquímica efetiva (Φ PSII) foi afetada de forma diferencial entre os cultivares, apresentando um aumento de 24% no Pitiúba com 75 mM de NaCl, porém permanecendo inalterada no TVu (Figura 4B). Souza *et al.* (2011) submeteu plantas de feijão de corda (cultivar Vita 7) à níveis de salinidade de até 200 mM de NaCl e não verificou mudanças significativas sobre a eficiência potencial do PS2, a qual permaneceu entre 0,82 e 0,85. No entanto, os autores observaram pequena diminuição na eficiência fotoquímica efetiva no tratamento com 200 mM de NaCl, comparadas com as plantas controles. Tais resultados podem sugerir uma possível resistência da atividade fotoquímica do feijão de corda ao estresse salino. Apesar dos resultados descritos acima, a maioria das espécies apresenta redução na eficiência fotoquímica do fotossistema 2 quando expostas à salinidade (NAIDOO; KIFT, 2006).

Na comparação com plantas controles, os coeficientes de extinção fotoquímico (qP) e de extinção não-fotoquímico (NPQ) não foram afetados pelo estresse salino (Figura 4C e D), exceto as plantas do cultivar Pitiúba submetidas a 75 e 100 mM de NaCl, que apresentaram reduções no NPQ de 52 e 35%, respectivamente. Souza *et al.* (2011), observaram pequenos decréscimos em qP, e pequenos aumentos do NPQ. Estes últimos provavelmente associados aos mecanismos de dissipação não fotoquímica da energia, em virtude da redução de assimilação líquida de CO₂ pelo estresse salino (SILVA *et al.*, 2011).

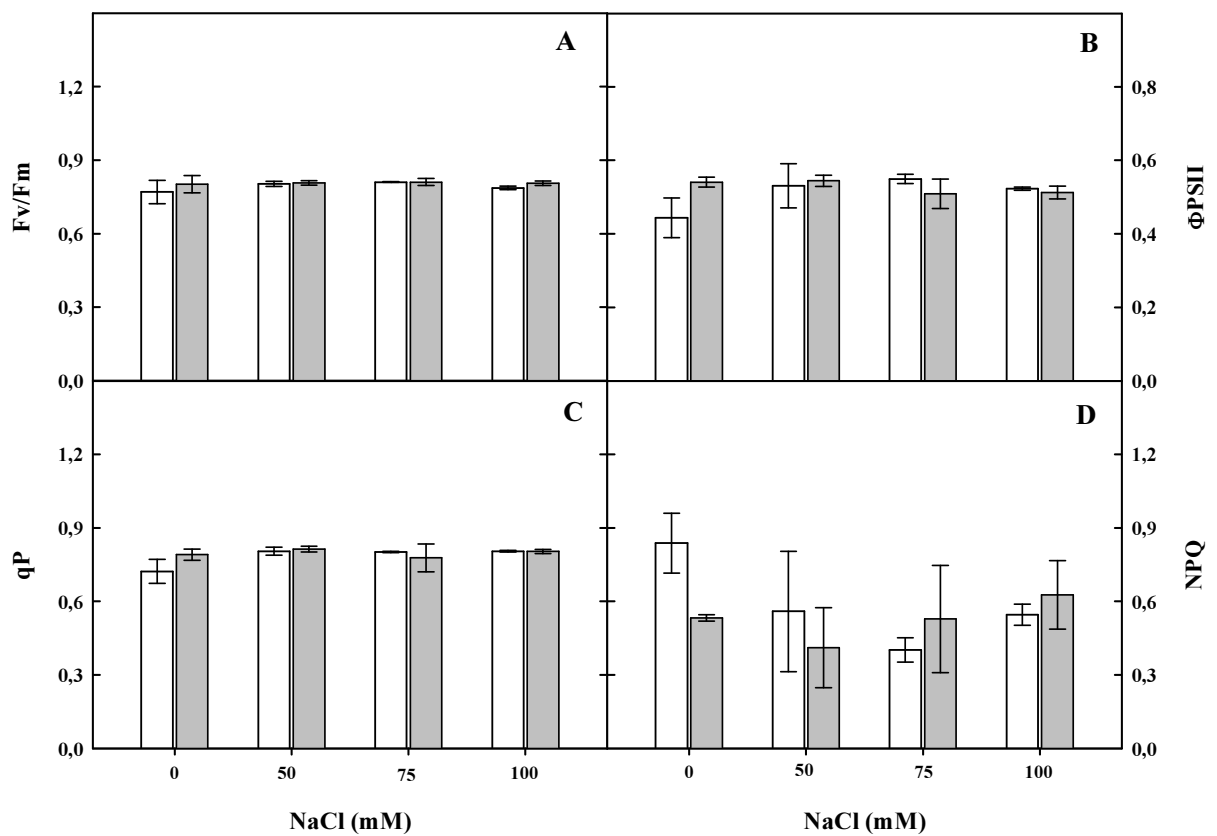


Figura 4. Eficiência potencial do fotossistema II (Fv/Fm, A), eficiência efetiva do fotossistema II (Φ PSII, B), “quenching” fotoquímico (qP, C) e “quenching” não-fotoquímico (NPQ, D) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Pitiúba (□) e TVu (■), submetidas a níveis crescentes de salinidade (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM). As barras representam o desvio padrão.

3.5- Trocas gasosas

As taxas de fotossíntese líquida das plantas de feijão de corda não sofreram alterações devido à salinidade (Figura 5A). Em diversas espécies submetidas à salinidade, a redução no crescimento é muitas vezes acompanhada pelo decréscimo na taxa fotossintética (GARCIA-SANCHES *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2012; M'RAH *et al.*, 2006; NAVARRO *et al.*, 2007). No entanto, há casos em que isso não ocorre, ou seja, o crescimento é reduzido, mas a fotossíntese líquida não é afetada. Rawat e Banerjee (1998), trabalhando com as espécies *Eucalyptus camaldulensis* e *Dalbergia sissoo*, encontraram baixa correlação entre as taxas fotossintéticas e a produção de biomassa sob condições de salinidade. Ressalta-se que a fotossíntese líquida é uma medida pontual e não necessariamente correlaciona-se com a taxa de assimilação líquida, que expressa a taxa de incremento diário de biomassa. Praxedes *et al.* (2010), trabalhando com esses dois cultivares de feijão de corda, observaram grandes reduções na taxa de assimilação líquida, com pequenas alterações na fotossíntese líquida expressa com base na área foliar. Souza *et al.* (2011) observaram reduções de 21 e 47% na fotossíntese líquida do feijão de corda, cultivar Vita 7, submetidos a 100 e 200 mM de NaCl, respectivamente.

A salinidade reduziu a condutância estomática dos cultivares estudados quando submetidos à doses crescentes de sal (Figura 5B). As maiores reduções observadas foram de 61% nas concentrações de 75 mM de NaCl para o cultivar no Pitiúba, e de 100 mM de NaCl para o cultivar TVu. Diferentemente do observado neste trabalho, Wilson *et al.* (2006) não encontraram diferenças nas respostas fotossintéticas e estomáticas entre quatro cultivares de feijão de corda (CB5, CB27, 8517 e 7964) para o aumento do estresse salino. Embora o cultivar TVu tenha mostrado uma tendência de inibição da fotossíntese no máximo nível de salinidade e uma condutância estomática menor que a do cultivar Pitiúba na última dose de sal (100 mM de NaCl), não houve inibição nos processos fotoquímicos da fotossíntese (Figura 4).

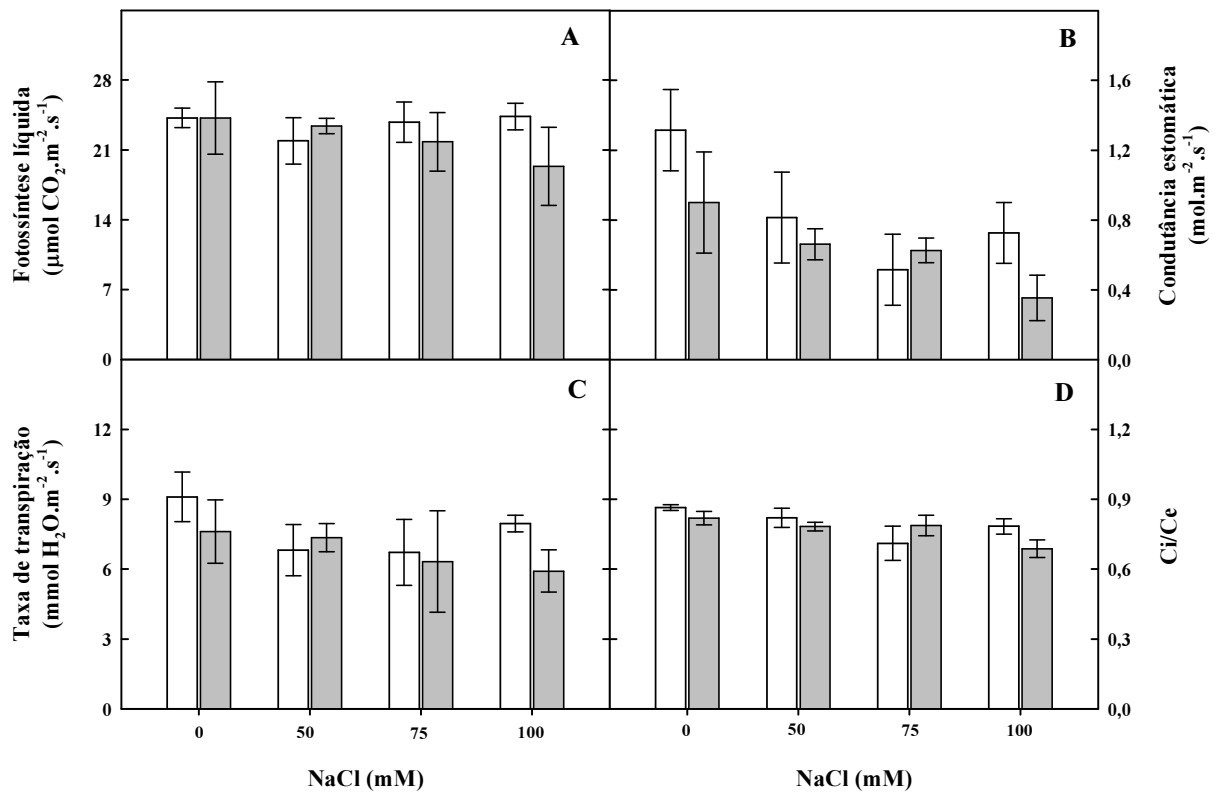


Figura 5. Fotossíntese líquida (A), condutância estomática (B), taxa de transpiração (C) e relação entre a concentração de CO_2 interna e externa (Ci/Ce , D) de plantas de feijão-de-corda, cultivar Pitiúba (□) e TVu (■), submetidas a níveis crescentes de salinidade (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM). As barras representam o desvio padrão.

As taxas de transpiração foram pouco reduzidas pelos níveis crescentes de salinidade, atingindo no tratamento com 100 mM de NaCl valores 12 e 22% menores, em relação aos controles, nos cultivares Pitiúba e TVu, respectivamente (Figura 5C). Zeng *et al.* (2001) verificaram que a transpiração e a condutância estomática diminuem com a salinidade, provavelmente pela queda do potencial da água nas raízes ou pelo transporte de ácido abscísico para as folhas (JAMES *et al.*, 2002).

A relação entre a concentração interna e externa de CO₂ (C_i/C_e) foi pouco afetada pelo estresse salino, atingindo a maior redução no tratamento de NaCl a 75 mM para o cultivar Pitiúba (18%), enquanto que o cultivar TVu sofreu uma redução de 16% no último nível de sal (Figura 5D). O decréscimo na relação C_i/C_e pode ser atribuído às menores condutâncias estomáticas, uma resposta comum das plantas ao estresse salino (PRAXEDES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011). Em contraste, Praxedes (2008) não detectou efeito diferencial do estresse salino com NaCl a 75 mM entre os cultivares Pitiúba e TVu na relação C_i/C_e.

3.6- Teores de sódio, potássio, cloreto e relação Na⁺/K⁺

Os teores de sódio nas folhas de ambos os cultivares foram aumentados pelas doses crescentes de NaCl até 100 mM (Figura 6A). Quando comparados aos tratamentos controle, os teores de sódio na dose de 100 mM de NaCl foram 277 e 120% maiores nos cultivares Pitiúba e TVu, respectivamente. Apesar do maior acúmulo de Na⁺ nas folhas, as plantas do cultivar Pitiúba apresentaram menores reduções na área foliar e na MSPA, quando comparadas com o TVu (Figura 1A e B). Nas raízes, observou-se um acúmulo diferencial de sódio entre os cultivares, com aumentos de 355 e 1011% nos teores desse íon para o Pitiúba e TVu, respectivamente, submetidos à dose de 75 mM de NaCl (Figura 6B). Em geral, os resultados obtidos mostram que o acúmulo de Na⁺ foi maior nas raízes do que nas folhas. De acordo com Praxedes *et al.* (2010), o mecanismo de restrição do movimento de Na⁺ para a

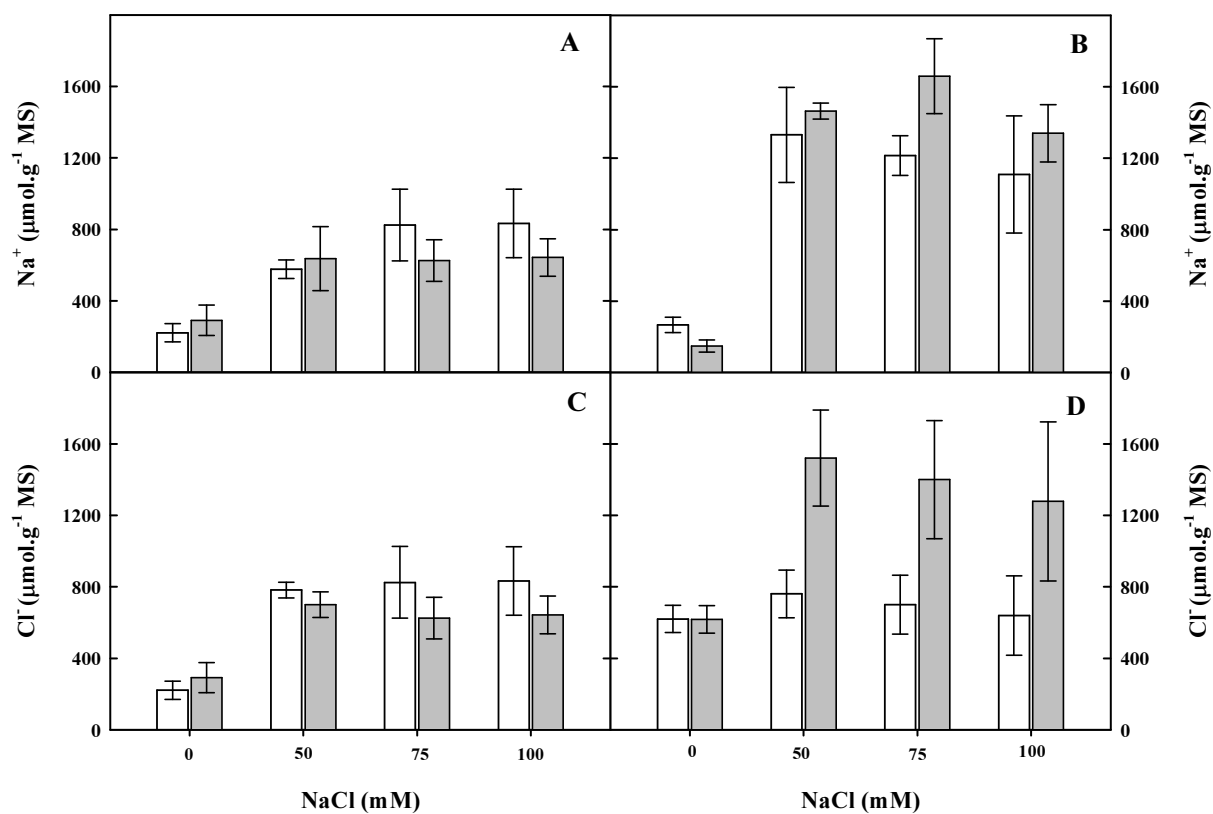


Figura 6. Teores de sódio (Na⁺) e cloreto (Cl⁻) em folhas (A e C) e raízes (B e D) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Pitiúba (□) e TVu (■), submetidas a níveis crescentes de salinidade (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM). As barras representam o desvio padrão.

parte aérea das plantas é uma característica associada à tolerância do gênero *Vigna* à salinidade.

Os teores de cloreto em condições salinas aumentaram nas folhas, apresentando um acúmulo médio nos tratamentos de NaCl a 75 e 100 mM de 275 e 117%, respectivamente, em relação aos controles nos cultivares Pitiúba e TVu (Figura 6C). Contudo, nas raízes, o maior acúmulo de cloreto foi observado no cultivar TVu, com um aumento médio de 126% em relação às plantas controle (Figura 6D). As diferenças no acúmulo de Cl^- observado nas raízes pode indicar mecanismos particulares para a manutenção da integridade e permeabilidade seletiva da membrana plasmática (GRATTAN; GRIEVE, 1999; VIÉGAS *et al.*, 2001).

Os teores de potássio foliares foram pouco afetados pela salinidade nos dois cultivares quando submetidos ao tratamento de NaCl, com uma tendência de redução na dose de 100 mM (Figura 7A). Nas raízes, os teores de K^+ no cultivar Pitiúba foram reduzidos em média 52% nas doses de 75 e 100 mM, enquanto no cultivar TVu os teores desse íon sofreram pouca alteração em relação ao controle (Figura 7B). A redução nos teores de K^+ é comum em plantas de feijão de corda sob condições de estresse salino com NaCl (COSTA *et al.*, 2003; MURILLO-AMADOR *et al.*, 2006). Segundo Lacerda *et al.* (2006), no entanto, os teores de K^+ nas folhas de plantas estressadas podem aumentar ou diminuir, em função do tempo de estresse e da idade da folha analisada.

A relação Na^+/K^+ nas folhas aumentou em função do estresse salino até a dose de 100 mM de NaCl, mas não houve diferença entre os cultivares (Figura 7C). Nas raízes, os maiores aumentos na relação Na^+/K^+ para ambos os cultivares ocorreu na dose de 75 mM de NaCl, sendo de 618% para o Pitiúba e de 1128% para o TVu (Figura 7D). Diferentemente do observado aqui, Lacerda *et al.* (2001) observaram que, sob condições salinas, a relação Na^+/K^+ foi quase duas vezes maior nos limbos do genótipo sensível de sorgo do que no tolerante.

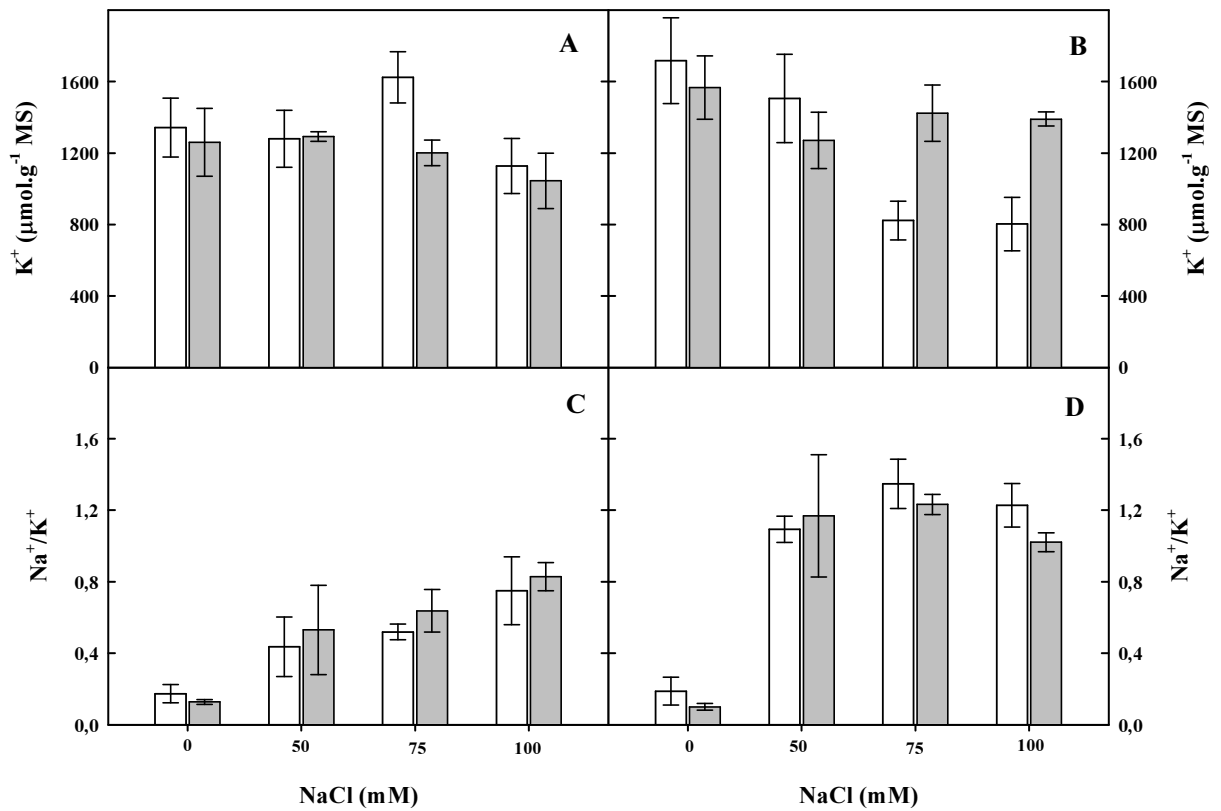


Figura 7. Teores de potássio e relação Na^+/K^+ em folhas (A e C) e raízes (B e D) de plantas de feijão-de-corda, cultivar Pitiúba (□) e cultivar TVu (■), submetidas a níveis crescentes de salinidade (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM). As barras representam o desvio padrão.

3.7- Teores de solutos orgânicos

3.7.1. Carboidratos solúveis

Os níveis crescentes de salinidade aumentaram os teores de carboidratos solúveis nas folhas, especialmente no cultivar TVu, que apresentou um aumento de 49% na concentração mais alta de sal (NaCl a 100 mM) em relação ao controle, enquanto o acúmulo de carboidratos nas folhas do Pitiúba foi de apenas 24% no mesmo nível de salinidade (Figura 8A). Por outro lado, nas raízes, os teores de carboidratos solúveis aumentaram no cultivar Pitiúba na concentração de 100 mM de NaCl, mas não foram alterados pela salinidade no cultivar TVu (Figura 8B). Mudanças nos teores de carboidratos solúveis têm sido relatadas em plantas submetidas à salinidade, o que sugere um papel desses solutos na adaptação das mesmas ao estresse salino (GARG *et al.*, 2002; KEREPESEI; GALIBA, 2000). De acordo com Koyro *et al.* (2006), a habilidade da halófita *Plantago coronopus* (L.) para enfrentar a salinidade está relacionada com a manutenção de altos níveis de carboidratos solúveis, os quais serviriam tanto para o ajustamento osmótico como para a estabilização de estruturas celulares. Em feijão de corda, o papel dos carboidratos é ainda discutível, visto que o seu acúmulo nas raízes dos cultivares Pitiúba, Vita 3 e TVu, respectivamente, o mais tolerante, o de tolerância intermediária e o mais sensível, não contribuíram para o ajustamento osmótico em condições de salinidade, pois nos cultivares foram observadas reduções quase semelhantes no crescimento vegetativo (Costa *et al.*, 2003).

3.7.2. N-aminossolúveis

Os teores de N-aminossolúveis nas folhas aumentaram em ambos os cultivares com a salinidade, no entanto, o acúmulo desses solutos no cultivar TVu foi maior do que no Pitiúba, cerca de 40% na última dose de NaCl, em relação ao controle (Figura 8C). Em contraste, nas raízes, os teores de N-aminossolúveis aumentaram 13% no Pitiúba e diminuíram em torno de

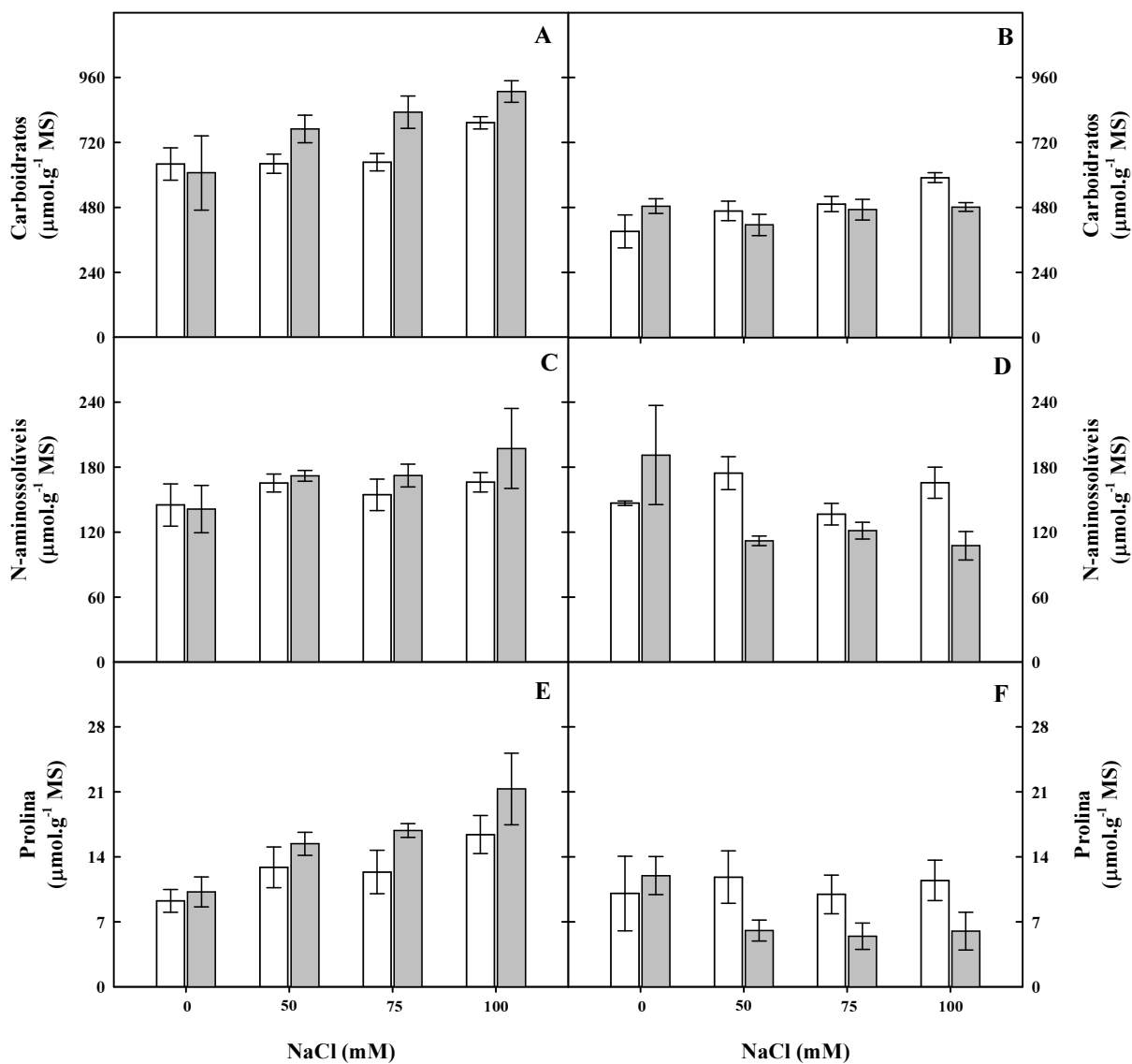


Figura 8. Teores de carboidratos, N-aminossolúveis e prolina livre em folhas (A, C e E) e raízes (B, D e F) de plantas de feijão-de-corda, cultivares Pitiúba (□) e TVu (■), submetidas a níveis crescentes de salinidade. (NaCl a 0, 50, 75 e 100 mM). As barras representam o desvio padrão.

44% nas plantas do TVu, em relação às plantas controles, no nível de 100 mM de NaCl (Figura 8D). O acúmulo de compostos contendo nitrogênio amino solúvel é uma resposta comum de plantas submetidas a estresses abióticos, como a salinidade, e pode funcionar como um dreno para o excesso de nitrogênio acumulado devido à redução no crescimento (GILBERT *et al.*, 1998).

3.7.3. Prolina livre

A salinidade alterou os teores de prolina livre de forma diferencial entre os cultivares estudados. Nas folhas, o acúmulo de prolina foi maior nas plantas do cultivar TVu tratadas com 100 mM de NaCl, em torno de 108% quando comparado às plantas controle (Figura 8E). No cultivar Pitiúba, o aumento no teor de prolina foi menor, em torno de 77%. Nas raízes, os teores de prolina no Pitiúba permaneceram inalterados com o aumento da concentração de NaCl. Por outro lado, no TVu, o estresse salino diminuiu os teores de prolina, em média 52%, quando submetido aos tratamentos de 50, 75 e 100 mM de NaCl (Figura 8F). O acúmulo de prolina ocorre em várias espécies, geralmente em resposta a estresses prolongados, sendo tal resposta também observada no feijão de corda (COSTA *et al.*, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2001). Praxedes (2008) trabalhando com feijão de corda, verificou que o cultivar Pitiúba não mostrou aumento significativo de prolina em folhas, enquanto que no cultivar TVu houve aumento significativo a partir de 10 dias de estresse salino. No entanto, em raízes, não houve diferenças significativas na concentração de prolina em ambos os cultivares. É fato que, em várias espécies vegetais, a prolina é o principal soluto orgânico que se acumula em resposta ao estresse salino, contudo, o papel benéfico desse acúmulo para a tolerância das plantas à salinidade é ainda bastante controverso e alguns estudos o consideram meramente um sintoma de estresse (LACERDA *et al.*, 2003; OZDEN; DEMIREL; KAHRAMAN, 2009).

3.8- Padrões protéicos bidimensionais

Para verificar os efeitos da salinidade, em concentrações crescentes de NaCl (50, 75 e 100 mM), no padrão de proteínas expressas nas folhas, géis bidimensionais foram elaborados para ambos os cultivares estudados. Experimentos preliminares utilizando tiras de gel com gradiente de pH de 3 a 10, revelaram que os “spots” protéicos dos tecidos de folhas estavam situados, em sua maioria, na faixa de pH de 4 a 7 (dados não mostrados). Dessa maneira, no presente estudo, a utilização de tiras de gel com faixa de pH mais estreita, de 4 a 7, possibilitou uma maior resolução dos “spots” protéicos e, conseqüentemente, uma melhor visualização e comparação das proteínas expressas em condições controle e de estresse salino.

Os géis das plantas do cultivar Pitiúba apresentaram, em média, 149 “spots” protéicos no tratamento controle, enquanto isso, nos géis das plantas submetidas à salinidade com NaCl a 50, 75 e 100 mM foram detectados 119, 139 e 108 “spots”, respectivamente (Figura 9). Na dose de 50 mM, a análise comparativa da expressão de 72 “spots” mostrou que 8 “spots” aumentaram de intensidade e 8 diminuíram em relação ao controle. Um total de 90 “spots” protéicos dos géis das plantas submetidas a 75 mM de NaCl foram analisados em relação ao controle. Destes, 12 tiveram suas expressões aumentadas e 17 foram reduzidos em função do estresse salino. De modo semelhante, de um total de 98 “spots” analisados das plantas sob estresse a 100 mM de NaCl, 13 “spots” tiveram suas expressões aumentadas e 5 foram reduzidos pela salinidade, quando comparados ao das plantas controle.

Os géis protéicos das plantas controle do cultivar TVu apresentaram, em média, 94 “spots” bem resolvidos, enquanto que nos tratamentos salinos o número de “spots” detectados foram de 117, 121 e 122 “spots”, em média, nas doses de 50, 75 e 100 mM de NaCl, respectivamente (Figura 10). Na concentração de NaCl de 50 mM, um total de 67 “spots” protéicos foram analisados em relação ao controle. Destes, 7 tiveram suas expressões aumentadas em função do estresse salino, enquanto que 11 foram reduzidos. Por sua vez, 66

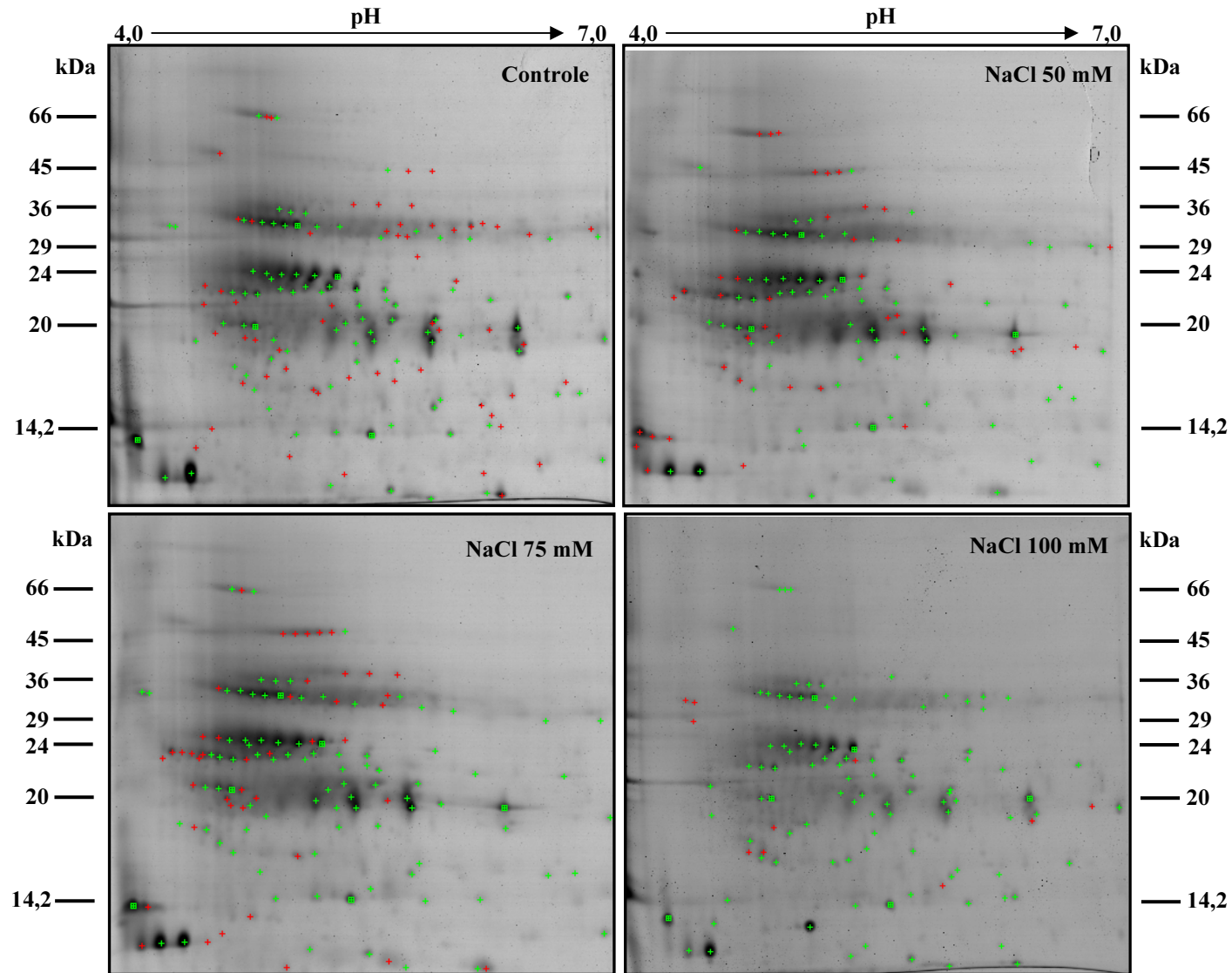


Figura 9. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de feijão de corda, cultivar Pitiúba, sob condições controle ou de estresse salino com NaCl a 50, 75 e 100 mM. Os “spots” marcados com sinal de + em verde representam os pares de “spots” analisados entre os tratamentos. Os mapas foram obtidos usando tiras de gel de 13 cm com gradiente de pH 4-7 na focalização isoeétrica e géis de poliacrilamida a 12,5% na SDS-PAGE. Em cada gel foram carregados 400 µg de proteínas, sendo os “spots” visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

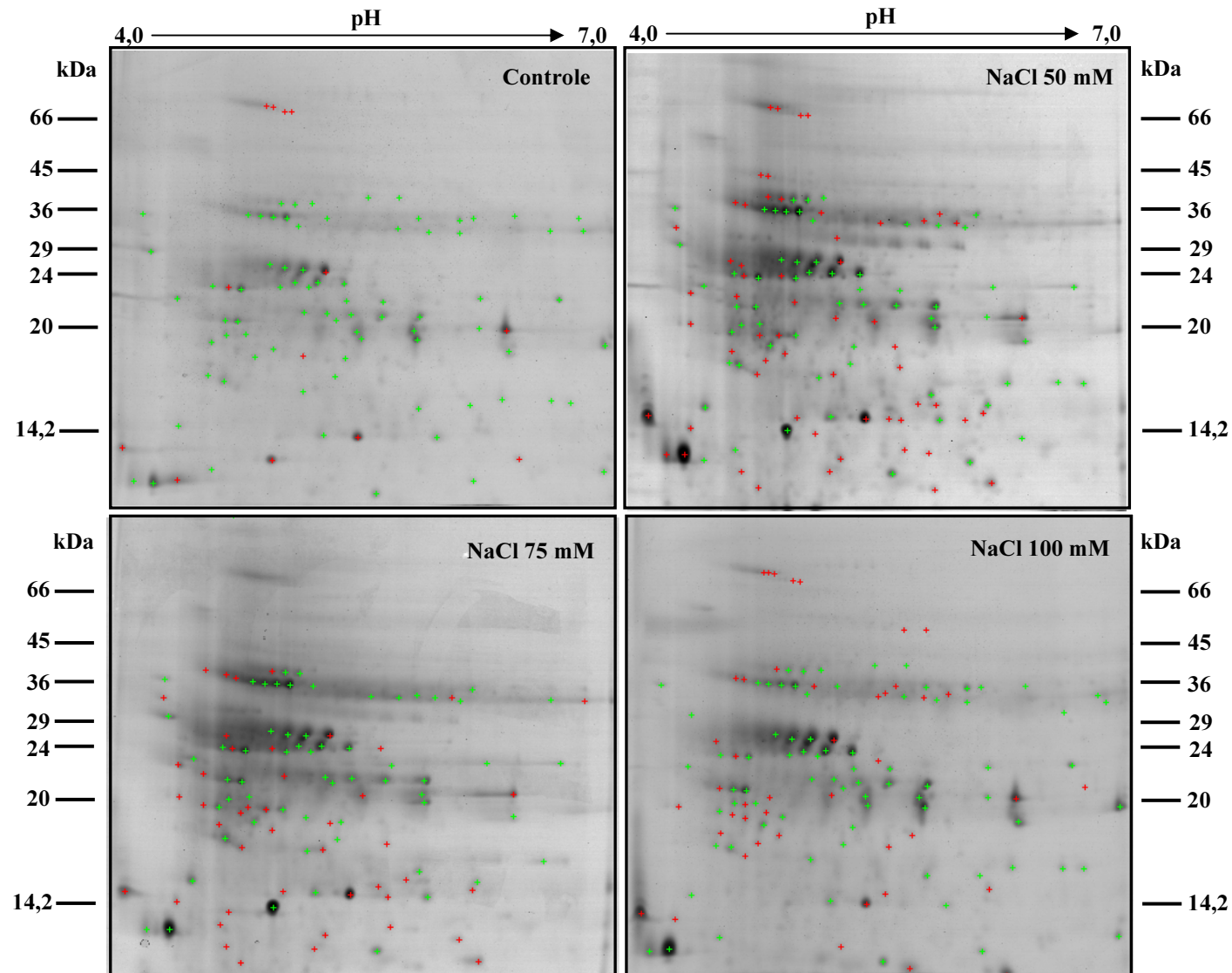


Figura 10. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de feijão de corda, cultivar TVu, sob condições controle ou de estresse salino com NaCl a 50, 75 e 100 mM. Os “spots” marcados com sinal de + em verde representam os pares de “spots” analisados entre os tratamentos. Os mapas foram obtidos usando tiras de gel de 13 cm com gradiente de pH 4-7 na focalização isoeétrica e géis de poliacrilamida a 12,5% na SDS-PAGE. Em cada gel foram carregados 400 µg de proteínas, sendo os “spots” visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

“spots” dos géis das plantas submetidas a 75 mM de NaCl foram comparados com os do controle, sendo observado aumentos de expressão em 10 deles e reduções em outros 12. Na dose mais alta de sal (NaCl a 100 mM), a análise comparativa de 82 “spots” mostrou que 52 foram expressos de forma semelhante, 19 aumentaram suas expressões e 11 reduziram, em função do estresse salino.

A análise global dos padrões eletroforéticos 2D mostrou que os níveis crescentes de NaCl alteraram de forma diferencial o padrão de expressão de proteínas nas folhas de plantas de feijão de corda. Alterações nos padrões de expressão das proteínas são comuns em plantas sob condições de estresse osmótico (PARIDA *et al.*, 2005). Corroborando com os resultados mostrados aqui, Gehlot, Purohit e Shekhawat (2005) observaram alterações no padrão de expressão das proteínas de sementes de gergelim (*Sesamum indicum*) tratadas com diferentes concentrações de sal. Em *Eucalyptus microtheca*, a comparação dos padrões protéicos de raízes de dois clones desta espécie submetidos ao estresse salino (NaCl a 200 mM), revelou a indução de uma proteína de 18 kDa em ambos os clones (MORABITO *et al.*, 1996). Zörb *et al.* (2004) verificaram alterações no padrão de expressão das proteínas de plantas de milho submetidas a baixas e altas concentrações de NaCl (25 e 100 mM). Vários pesquisadores sugerem que a tolerância das plantas envolve um complicado sistema regulado por diversos genes, os quais estão relacionados às diversas vias metabólicas e de sinalização (VINOCUR; ALTMAN, 2005). Portanto, a reorganização no padrão de proteínas das plantas durante o estresse salino pode estar relacionado com as mudanças nos processos de homeostase, como regulação dos processos de absorção de íons, redução do crescimento, alterações nas funções celulares e/ou expressão gênica.

4. CONCLUSÕES

As respostas fisiológicas e bioquímicas dos cultivares Pitiúba e TVu à salinidade dependeram da intensidade do estresse, sendo as maiores reduções no crescimento e nos parâmetros fotossintéticos observadas no cultivar mais sensível, o TVu. Por outro lado, este cultivar apresentou os menores teores de íons nas folhas e os maiores acúmulos de solutos compatíveis nos tecidos em condições de estresse salino. Sendo assim, estes mecanismos sozinhos não explicam a tolerância diferencial ao sal, o que revela a complexidade dos mecanismos de tolerância à salinidade.

No presente estudo, as maiores alterações no padrão de expressão de proteínas foram encontradas na concentração mais alta de NaCl, no entanto, vale ressaltar que nesse nível de estresse parte das alterações observadas podem não representar respostas de aclimatação, mas sim sintomas de injúrias causadas pela salinidade, especialmente no cultivar mais sensível, o TVu. Portanto, novos trabalhos que envolvam a caracterização das proteínas diferencialmente expressas nestes cultivares de feijão de corda devem ser realizados, preferencialmente, com concentrações moderadas de sal (p. ex. NaCl a 75 mM).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v. 166, p. 3-16, 2004.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, J. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 246-254, 1976.

CARUSO, G.; CAVALIERE, C.; GUARINO, C.; GUBBIOTTI, R.; FOGLIA, P.; LAGANÀ, A. Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 381-390, 2008.

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-80, 1975.

CATSKY, J. Determination of water deficits in disc cut out from leaf blades. **Biologia Plantarum**, v. 2, p. 929- 938, 1960.

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 Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 289-297, 2003.

DEBOUBA, M.; GOUIA, H.; VALADIER, M. H; GHORBEL, M. H, SUZUKI, A. Salinity-induced tissue-specific diurnal changes in nitrogen assimilatory enzymes in tomato seedlings grown under high or low nitrate medium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 409-419, 2006.

DEEBA, F.; PANDEY, A. K.; RANJAN, S.; MISHRA, A.; SINGH, R.; SHARMA, Y. K.; SHIRKE, P. A.; PANDEY, V. Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 53, p. 6-18, 2012.

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

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

GARCÍA-SÁNCHEZ, F.; SYVERTSEN, J. P.; MARTÍNEZ V.; MELGAR, J. C. Salinity tolerance of ‘Valencia’ orange trees grafted on contrasting rootstocks is not improved by moderate shade. **Journal Experimental Botany**, v. 57, p. 3697-3706, 2006.

GARG, A. K.; KIM, J. -K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; CHOI, Y. D.; KOCHIAN, L. V.; WU, R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance to different abiotic stresses. **PNAS**, v. 99, p. 15898-15903, 2002.

GEHLOT, H. S.; PUROHIT, A.; SHEKHAWAT, N. S. Metabolic changes and protein patterns associated with adaptation to salinity in *Sesamum indicum* cultivars. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 4, p. 31-39, 2005.

GHOULAM, C.; FOURSRY, A.; FARES, K. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 39-50, 2002.

GILBERT, G. A.; GADUSH, M. V.; WILSON, C.; MADORE, M. A. Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. during salinity stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 107-114, 1998.

GLYNN, P.; FRASER, C.; GILLIAN, A. Foliar salt tolerance of Acer genotypes using chlorophyll fluorescence. **Journal of Arboriculture**, v. 29, p. 61-65, 2003.

GRATTAN, S. R.; GRIEVE, C. M. Salinity-mineral nutrient relation in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 127-157, 1999.

GUIMARÃES, F. V. A.; LACERDA, C. F.; MARQUES, E. C.; ABREU, C. E. B.; AQUINO, B. F.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Supplemental Ca²⁺ does not improve growth but it affects nutrient uptake in NaCl cowpea plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, p. 8-17, 2012.

HAJLAOUI, H.; AYEB, N. E.; GARREC, J. P.; DENDEN, M. Differential effects of salt stress on osmotic adjustment and solutes allocation on the basis of root and leaf tissue senescence of two silage maize (*Zea mays* L.) varieties. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 122-130, 2010.

HUANG, Z.; LONG, X. ; WANG, L. ; KANG, J.; ZHANG, Z.; ZED, R.; LIU, Z. Growth, photosynthesis and H⁺-ATPase activity in two Jerusalem artichoke varieties under NaCl-induced stress. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 591-596, 2012.

- HUSSAIN, K.; NISAR, M. F.; MAJEED, A.; NAWAZ, K.; BHATTI, K. H.; AFGHAN, S.; SHAHAZAD, A.; ZIA-UL-HUSSNIAN, S. What molecular mechanism is adapted by plants during salt stress tolerance? **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 416-422, 2010.
- JAMES, R. A.; RIVELLI, A. R.; MUNNS, R.; VON CAEMMERER, S. Factors affecting CO₂ assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 1393-1403, 2002.
- JELLOULI, N.; JOUIRA, H. B.; SKOURI, H.; GHORBEL, A.; GOURGOURI, A.; MLIKI, A. Proteomic analysis of Tunisian grapevine cultivar Razegui under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 471-481, 2008.
- KAO, W. -Y.; TSAI, T. -T.; TSAI, H. -C.; SHIH, C. -N. Response of three *Glycine* species to salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 120-125, 2006.
- KEREPESI, I.; GALIBA, G. Osmotic and stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. **Crop Science**, v. 40, p. 482-487, 2000.
- KEUTGEN, A. J.; PAWELZIK, E. Impacts of NaCl stress on plant growth and mineral nutrient assimilation in two cultivars of strawberry. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, p. 170-176, 2009.
- KOYRO, H. -W. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 136-146, 2006.
- LACERDA, C. F.; CAMBRAIA, J.; CANO, M. A. O.; RUIZ, H. A. Plant growth and solute accumulation and distribution in two sorghum genotypes, under NaCl stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 270-284, 2001.
- LACERDA, C. F.; CAMBRAIA, J.; CANO, M. A. O.; RUIZ, H. A.; PRISCO, J. T. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 107-120, 2003.

LACERDA, C. F.; ASSIS JÚNIOR, J. O.; LEMOS FILHO, L. C. A.; GUIMARÃES, F. V. A.; OLIVEIRA, T. S.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T.; BEZERRA, M. A. Morphophysiological responses of cowpea leaves to salt stress. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 18, p. 455-465, 2006.

MA, H. C.; FUNG, L.; WANG, S. S.; ALTMAN, A.; HÜTTERMANN, A. Photosynthetic response of *Populus euphratica* to salt stress. **Florest Ecology and Management**, v. 93, p. 55-61, 1997.

MAJOUL, T.; CHAHED, K.; ZAMITI, E.; OUELHAZI, L.; GHRIR, R. Analysis by two-dimensional electrophoresis of the effect of salt stress on the polypeptide patterns in roots of a salt-tolerant and a salt-sensitive cultivar of wheat. **Electrophoresis**, v. 21, p. 2562-2565, 2000.

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

M'RAH, S.; OUERGHI, Z.; BERTHOMIEU, C.; HAVAUX, M.; JUNGAS, C.; HAJJI, M.; GRIGNON, C.; LACHAÂL, M. Effects of NaCl on the growth, ion accumulation and photosynthetic parameters of *Thellungiella halophila*. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 1022-1031, 2006.

MORABITO, D.; JOLIVET, Y.; PRAT, D.; DIZENGREMEL, P. Differences in the physiological responses of two clones of *Eucalyptus microtheca* selected for their salt tolerance. **Plant Science**, v. 114, p. 129-139, 1996.

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

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, v. 167, p. 645-663, 2005.

MURILLO-AMADOR, B.; TROYO-DIEGUEZ, E.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, J. L.; LÓPEZ-AGUILAR, R.; ÁVILA-SERRANO, N. Y.; ZAMORA-SALGADO, S.; RUEDA-PUENTE, E. O.; KAYA, C. Effect of NaCl salinity in the genotypic variation of cowpea (*Vigna unguiculata*) during early vegetative growth. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, p. 423-431, 2006.

- NABIL, M., COUDRET, A. Effects of sodium chloride on growth, tissue elasticity and solute adjustment in two *Acacia nilotica* subspecies. **Physiologia Plantarum**, v. 93, p. 217-224, 1995.
- NAIDOO, G.; KIFT, J. Responses of the saltmarsh rush *Juncus kraussii* to salinity and waterlogging. **Aquatic Botany**, v. 84, p. 217-225, 2006.
- NAVARRO, A.; BAÑON, S.; OLMOS, E; SÁNCHEZ-BLANCO, M. J. Effects of sodium chloride on water potential components, hydraulic conductivity, gas exchange and leaf ultrastructure of *Arbutus unedo* plants. **Plant Science**, v. 172, p. 473-480, 2007.
- NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262, 1988.
- OZDEN, M.; DEMIREL, U.; KAHRAMAN, A. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 163-168, 2009.
- PANDA, S. K.; UPADHYAY, R. K.; UPADHYAYA, H. Salinity stress induced physiological and biochemical changes in *Azolla pinnata*. **Acta Botanica Hungarica**, v. 48, n. 3-4, p. 369-380, 2006.
- PARIDA, A. K.; DAS, A. B.; MITTRA, B. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. **Trees**, v. 18, p. 167-174, 2004.
- PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324-349, 2005.
- PARIDA, A. K.; MITTRA, B.; DAS, A. B.; DAS, T. K.; MOHANTY, P. High salinity reduces the content of a highly abundant 23-kDa protein of the mangrove *Bruguiera parviflora*. **Planta**, v. 221, p. 135-140, 2005.

PERCIVAL, G. C.; FRASER, G. A. Measurement of the salinity and freezing tolerance of *Crataegus* genotypes using chlorophyll fluorescence. **Journal Arboriculture**, v. 27, p. 233-245, 2001.

PRAXEDES, S. C. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em dois cultivares de feijão-de-feijão com tolerância diferencial à salinidade**. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

PRAXEDES, S. C.; LACERDA, C. F.; DAMATTA, F. M.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Salt tolerance is associated with differences in ion accumulation, biomass allocation and photosynthesis in cowpea cultivars. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 196, p. 193-204, 2010.

RABILLOUD, T.; ADESSI, C.; GIRAUDEL, A.; LUNARDI, J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 18, p. 307-316, 1997.

RAWAT, J. S.; BANERJEE, S. P. The influence of salinity on growth, biomass production and photosynthesis of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. and *Dalbergia sissoo* Roxb. Seedlings. **Plant and Soil**, v. 205, p. 163-169, 1998.

REJILI, M.; VADEL, A. M.; GUETET, A.; NEFFATTI, M. Effect of NaCl on the growth and the ionic balance K^+/Na^+ of two populations of *Lotus creticus* (L.) (Papilionaceae). **South African Journal of Botany**, v. 73, p. 623-631, 2007.

SHEN, S.; MATSUBAE, M.; TAKAO, T.; TANAKA, N.; KOMATSU, S. A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. **Journal of Biochemistry**, v. 132, p. 613-620, 2002.

SILVA, J. V.; LACERDA, C. F.; COSTA, P. H. A.; ENÉAS FILHO, J.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T. Physiological responses of NaCl stressed cowpea plants grown in nutrient solution supplemented with $CaCl_2$. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 99-105, 2003.

SILVA, E. N.; RIBEIRO, R.V.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Salt stress induced damages on the photosynthesis of physic nut young plants. **Scientia Agricola**, v. 68, p. 62- 68, 2011.

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

SOUZA R. P.; MACHADO E. C.; SILVEIRA J. A. G.; RIBEIRO R. V. **Fotossíntese e acúmulo de solutos em feijoeiro caupi submetido à salinidade**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 46, p. 586-592, 2011.

TEIXEIRA, S. M.; MAY, P. H.; SANTANA, A. C. Produção e importância econômica do caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-CNPAP, 1988. p. 101-136.

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

VINCENT, D.; ERGÜL, A.; BOHLMAN, M. C.; TATTERSALL, E. A. R.; TILLET, R. L.; WHEATLEY, M. D.; WOOLSEY, R.; QUILICI, D. R.; JOETS, J.; SCHLAUCH, K.; SCHOOLEY, D. A.; CUSHMAN, J. C.; CRAMER, G. R. Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 1873-1892, 2007.

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

WILSON, C., LIU, S., LESCH, S. M., SUAREZ, D. L. Growth response of major USA cowpea cultivars: II. Effect of salinity on leaf gas exchange. **Plant Science**, v. 170, p. 1095-1101, 2006.

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

ZANG, X.; KOMATSU, S. A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. **Phytochemistry**, v. 68, p. 426-437, 2007.

ZENG, L.; SHANNON, M. C.; LESCH, S. M. Timing of salinity stress affects rice growth and yield components. **Agriculture and Water Management**, v. 48, p. 191-206, 2001.

ZÖRB, C.; SCHMITT, S.; NEEB, A.; KARL, S.; LINDER, M.; SCHUBERT, S. The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. **Plant Science**, v. 167, p. 91-100, 2004.

Experimento - 2

***PROTEÔMICA COMPARATIVA EM PLANTAS DE FEIJÃO DE CORDA DURANTE O
PERÍODO DE ESTRESSE SALINO E DE RECUPERAÇÃO***

PROTEÔMICA COMPARATIVA EM PLANTAS DE FEIJÃO DE CORDA DURANTE O PERÍODO DE ESTRESSE SALINO E DE RECUPERAÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O estresse salino em plantas pode ser decorrente do uso de águas salinas ou sódicas ou do crescimento das plantas em solos salinizados. O processo de salinização dos solos é comum nas regiões áridas e semi-áridas, e se dá pelo acúmulo predominante dos cátions Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} e dos ânions Cl^- e SO_4^{2-} (LACERDA *et al.*, 2010). Como consequência desse processo, tem-se a perda da capacidade produtiva dos solos e enormes prejuízos sócio-econômicos.

A salinidade conduz à inibição do crescimento, murcha ou mesmo à morte das plantas, especialmente em altas concentrações de sais. As respostas das plantas às condições de estresse envolvem alterações na expressão gênica e, portanto, na síntese (aumento ou redução) de várias proteínas, as quais estão envolvidas em processos biológicos específicos (VINOCUR; ALTMAN, 2005). A análise proteômica é uma poderosa ferramenta molecular que facilita a visualização e comparação de uma mistura complexa de proteínas, e permite a identificação e caracterização funcional das proteínas diferencialmente expressas em condições de estresses ambientais (SOBHANIAN; AGHAEI; KOMATSU, 2011). Recentemente, vários estudos proteômicos com plantas sob estresse salino foram publicados (CARUSO *et al.*, 2008; JELLOULI *et al.*, 2008; VINCENT *et al.*, 2007), sendo as mudanças na acumulação e composição de proteínas relacionadas com as variações fenotípicas das plantas que determinam a tolerância à salinidade. Em plantas de pepino, Du *et al.* (2010) identificaram 29 proteínas que sofreram alterações nos níveis de expressão devido ao estresse com NaCl a 50 mM. Estas proteínas tiveram funções relacionadas ao metabolismo primário, energia e transporte de íons, funções regulatórias (HSP) e de defesa contra o estresse

oxidativo induzido pela salinidade. Em hypocótilos e raízes de soja sob salinidade, as mudanças na abundância de 7 proteínas indicaram que elas desempenham papel fundamental na aclimatação às condições salinas (AGHAEI *et al.*, 2009).

Segundo Kosová *et al.* (2011), cada fase de resposta das plantas ao estresse pode ser caracterizada por sua composição única no proteoma. Para muitos tipos de estresses abióticos, incluindo o salino, há uma reorganização no metabolismo celular das plantas sob estresse que desviam os processos ativos do crescimento e desenvolvimento para os processos de aclimatação ao estresse. A fase inicial (alarme) se caracteriza pela indução de vias de sinalização (proteínas quinases do tipo MAPKs) e um estresse oxidativo provocado pelo sal. Posteriormente, na fase de aclimatação, ocorre a síntese *de novo* de várias proteínas protetoras (chaperonas, proteínas LEA, enzimas antioxidantes) e outros compostos (antioxidantes – ascorbato, glutathiona, carotenóides e tocoferol; osmoprotetores – prolina e glicinabetaina). Isto resulta no estabelecimento de uma nova homeostase metabólica, a qual pode ser mantida por vários dias em condições de estresse (ZHU, 2002). Após o período de estresse, durante a fase de recuperação, processos que levam à degradação dos compostos sintetizados são ativados e a homeostase celular é restabelecida sob condições controle. Essa dinâmica das respostas das plantas ao estresse tem recebido pouca atenção. Assim, a maioria das informações sobre as mudanças no proteoma de plantas sob condições de salinidade é fragmentada, comparando apenas plantas não estressadas (controle) e plantas estressadas (KOSOVÁ *et al.*, 2011).

O feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.) é uma cultura de grande importância na produção agrícola nordestina, servindo de alimento básico para a população devido ao alto valor nutricional (TEIXEIRA *et al.*, 1988). Além disso, é muito valiosa como forrageira, pois comparado a outras leguminosas, como a soja, o feijão-comum, a ervilha, o amendoim, etc., o feijão de corda apresenta características superiores para a recuperação de áreas degradadas,

uma vez que em associação com rizóbio nativo torna-se eficiente fixador de nitrogênio sob as mais adversas condições (EHLERS; HALL, 1997). Entretanto, a produtividade do feijão de corda é afetada de maneira adversa por estresses abióticos, como o salino. Embora algumas respostas fisiológicas e bioquímicas à salinidade tenham sido estudadas em plantas de feijão de corda, incluindo processos como a fotossíntese, o metabolismo do nitrogênio e as homeostases iônica e osmótica (MURILLO-AMADOR *et al.*, 2006; PRAXEDES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2001), o conhecimento sobre os processos moleculares básicos envolvidos com a tolerância desta cultura à salinidade ainda são escassos. Portanto, esforços para investigar os mecanismos moleculares de aclimatação ao estresse salino são de fundamental importância para aumentar a tolerância/produção do feijão de corda.

No presente estudo, que parece ser o primeiro sobre a caracterização proteômica das respostas à salinidade em folhas de feijão de corda, técnicas de eletroforese 2D e de espectrometria de massas foram usadas para monitorar as alterações no proteoma das folhas de dois cultivares de feijão de corda, buscando a identificação de algumas proteínas diferencialmente expressas durante o estresse salino e após um período de recuperação. As funções biológicas das proteínas identificadas e suas relações com a tolerância ao estresse foram discutidas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Condições de cultivo das plantas

Sementes de feijão de corda (*V. unguiculata*) foram fornecidas pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará (UFC). As sementes dos cultivares Pitiúba e TVu 2331, respectivamente, tolerante e sensível à salinidade (COSTA *et al.*, 2003; PRAXEDES *et al.*, 2010), foram tratadas com solução de NaOCl a 1% (v/v) por 5 min e, em seguida, lavadas com água destilada. As sementes de ambos os cultivares foram semeadas em

copos plásticos contendo vermiculita umedecida com solução nutritiva de Hoagland (1:2) ou essa mesma solução com NaCl a 75 mM, e deixadas sob condições de casa de vegetação. Os copos foram irrigados com água destilada e com suas respectivas soluções em dias alternados. Aos cinco dias após a sementeira, as plântulas mais uniformes de cada cultivar foram transferidas para vasos de 6 L (duas plantas por vaso) com solução nutritiva (tratamento controle) ou solução nutritiva com NaCl a 75 mM (estresse salino). Doze dias após essa transferência, um grupo de plantas crescidas sob condições salinas foram transferidas para vasos com solução nutritiva sem NaCl (tratamento de recuperação), onde permaneceram por mais 5 dias até o momento da coleta. A coleta das plantas dos tratamentos ocorreu aos 22 dias após a sementeira. As soluções nutritivas foram aeradas constantemente e seus níveis mantidos pela adição diária de água destilada. As trocas de soluções foram efetuadas a cada cinco dias para evitar restrições de nutrientes. Durante o período experimental, os valores médios de temperatura e umidade relativa do ar, no interior da casa de vegetação, registrados com um termohigrógrafo, foram de $29,7 \pm 0,6$ °C e $69,7 \pm 1,5\%$, respectivamente. A radiação fotossinteticamente ativa média na casa de vegetação, ao meio-dia, foi de $1500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

2.2- Coleta e crescimento das plantas

As plantas foram divididas em folhas, caules e raízes, sendo a área foliar (AF) obtida com um medidor de área (LI-3100, Li-COR, Inc., Lincoln, NE, USA). Amostras de folhas (2ª e 3ª folhas completamente expandidas, a contar do ápice do ramo principal) foram separadas, congeladas em N₂ líquido e liofilizadas para serem utilizadas nas análises proteômicas. O restante do material foi colocado em estufa a 60 °C até atingir peso constante. Com essas medidas, foram estimadas as matérias secas das partes das plantas e, portanto, a relação de matéria seca das raízes pela da parte aérea (MSR/MSPA).

2.3- Relações hídricas

O teor relativo de água (TRA) foi determinado como descrito por Catský (1960). Nas primeiras folhas completamente expandidas, de cada planta no vaso, foram retirados 5 discos de 1 cm de diâmetro. Após pesagem e obtenção da massa fresca (MF), os discos foliares permaneceram em água destilada por 3 h até atingirem a massa túrgida (MT). Em seguida, os discos foram colocados em estufa a 60 °C durante 72 h, para obtenção da massa seca (MS). Os dados obtidos foram inseridos na fórmula: $TRA (\%) = [(MF-MS) / (MT-MS)] \times 100$.

O restante do material das folhas que foram utilizadas para o TRA foi congelado e armazenado a -25 °C para posterior extração do suco e determinação do potencial osmótico (Ψ_s). Para obtenção dos sucos foliares, o material, após degelo, foi macerado em almofariz, à temperatura ambiente, seguido de prensagem do mesmo (envolto num tecido de náilon) com o êmbolo de uma seringa descartável de 10 mL. O líquido obtido após a prensagem foi centrifugado a 12000 x g por 10 min e o sobrenadante utilizado para a determinação do Ψ_s em um microsmômetro (VAPRO 5520, Wescor, Logan, Utah, USA), tomando-se uma alíquota de 10 µL. Os valores de Ψ_s foram expressos em MPa.

2.4- Análise proteômica

A análise proteômica comparativa entre os cultivares de feijão de corda foi realizada em tecidos foliares das plantas sob condições controle, de estresse salino (NaCl a 75 mM) e após o período de recuperação do estresse.

2.4.1. Extração das proteínas totais

Amostras de tecido liofilizado de folhas foram finamente trituradas com o auxílio de almofariz e pistilo até adquirirem o aspecto de farinha, a qual foi utilizada para a extração das proteínas segundo o método descrito por Shen *et al.* (2002). Cerca de 200 mg do tecido

vegetal liofilizado foram homogeneizados, juntamente com 200 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP), em 5,0 mL de tampão Tris-HCl a 40 mM, pH 7,5, contendo sacarose a 250 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10 mM, Triton X-100 a 1%, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) a 1,0 mM e ditioneitol (DTT) a 1,0 mM. A mistura foi agitada por 1 h a 4 °C e, em seguida, centrifugada a 15.000 x g por 15 min a 4 °C. Para precipitação das proteínas, ao sobrenadante foram adicionados 10 mL de TCA a 10%, em acetona gelada, sendo a mistura, após homogeneização, deixada em repouso por uma noite a -20 °C. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 15.000 x g por 15 min, sendo o precipitado submetido a lavagens com acetona gelada. O precipitado foi seco a vácuo e utilizado nas eletroforeses bidimensionais.

2.4.2. Dosagem de proteínas

O método de Bradford (1976) foi empregado para determinar a quantidade de proteínas obtida do processo de extração e estimar a quantidade de proteínas a ser utilizada nas eletroforeses. À 100 µL da amostra, convenientemente diluída, foi adicionado 1,0 mL de uma solução de Coomassie Blue G-250 a 0,01% contendo etanol a 4,75% e ácido fosfórico a 8,5%. A mistura foi deixada em repouso por 15 min e, em seguida, submetida a leituras de absorvância em 595 nm. Albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, USA) foi utilizada como padrão na curva de calibração.

2.4.3. Eletroforese bidimensional e revelação dos spots

As amostras protéicas foram solubilizadas em 300 µL de uma solução contendo uréia a 7 M, tiouréia a 2 M, CHAPS a 2% (m/v), IPG buffer 3-10 a 2% (v/v) e DTT a 0,3% (m/v), como descrito previamente por Rabilloud *et al.* (1997). As proteínas foram solubilizadas por um período mínimo de 1 h, à temperatura ambiente, com agitações vigorosas ocasionais, e

centrifugadas a 12.000 x g por 10 min. Posteriormente, com base nos resultados de dosagens das proteínas, volumes apropriados da amostra (sobrenadante) contendo aproximadamente 400 µg de proteínas foram diluídos em solução de reidratação [uréia a 8 M, CHAPS a 2% (m/v), IPG buffer 3-10 a 2% (v/v), DTT a 0,3% e azul de bromofenol a 0,002% (m/v)] para um volume final de 0,25 mL e aplicados em uma bandeja de reidratação (*Reswelling Tray*, Pharmacia Biotech). Em seguida, tiras de gel com gradiente de pH imobilizado (*Immobiline DryStrip*, pH 4-7, GE-Healthcare) foram deixadas em contato com a mistura na bandeja durante a noite, à temperatura ambiente.

A focalização isoeétrica foi realizada no equipamento Multiphor II (Pharmacia Biotech), à temperatura constante de 20 °C, com o auxílio da fonte EPS 3501 XL (GE-Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. A corrida foi realizada em três fases no módulo gradiente. A voltagem foi inicialmente aumentada para 300 V durante 5 min, em seguida, aumentada lentamente para 3500 V por 1:30 h e finalmente mantida em 3500 V por 4:10 h. Após a focalização, as tiras foram equilibradas sob agitação em solução de equilíbrio (Tris-HCl a 50 mM, pH 8,8, uréia a 6 M, glicerol a 30%, SDS a 2% e azul de bromofenol) com DTT a 1% (m/v) por 15 min e, em seguida, por 15 min com iodoacetamida a 2,5% (m/v). Terminado o equilíbrio, as tiras foram fixadas no topo de géis de poliacrilamida na concentração de 12,5% (16 x 18 cm) e seladas com uma solução de agarose a 0,5% e azul de bromofenol a 0,002% (m/v). A segunda dimensão foi realizada na unidade de eletroforese vertical SE 600 Ruby (GE-Healthcare), sendo o sistema alimentado pela fonte EPS 3501 XL. Para cada gel, foi aplicada uma corrente constante de 15 mA durante 30 min e, em seguida, uma corrente de 25 mA até o azul de bromofenol atingir o final do gel. Juntamente com a amostra, foi aplicada uma mistura de proteínas com massas moleculares conhecidas (MW Marker Kit Range: 14.000-70.000, Sigma-Aldrich, USA).

Depois de fixadas no gel com uma solução de ácido acético a 10% (v/v) e etanol a 40% (v/v), as proteínas separadas foram coradas com solução de Coomassie Blue G-250 coloidal a 0,1% (v/v) (NEUHOFF *et al.*, 1988). Os géis foram escaneados utilizando-se o programa LabScan v. 5.0 (GE-Healthcare) no ImageScanner (Amersham Biosciences) e as imagens obtidas analisadas no programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE-Healthcare). Através deste programa foram estimados os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada “spot”.

2.4.4. Análise das imagens

Para a comparação dos géis utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum, as imagens dos géis obtidos foram previamente padronizadas com o intuito de minimizar distorções nas análises. Nas configurações de exibição dos géis determinou-se a escala de cinza, formato TIFF com resolução de 300 dpi. A detecção dos “spots” foi realizada com subtração do fundo e detecção automática (contraste de 30%, área mínima de 70% e saliência de 200), seguida de correções manuais. Os géis bidimensionais dos cultivares Pitiúba e TVu de feijão de corda foram comparados da seguinte forma: os “spots” das triplicatas dos géis do tratamento controle foram comparados entre si, assim como os “spots” das triplicatas dos géis dos tratamentos salino (NaCl a 75 mM) e de recuperação do estresse. Um total de 9 géis para cada cultivar foram comparados entre si. Nas comparações, os géis tiveram seus spots iguais ligados por meio de “landmarks” e identificados numericamente. Em seguida, os valores de volumes gerados pelo programa para cada “spot” foram usados para os cálculos de correlação. O gel que apresentou o coeficiente de correlação que mais assemelhava entre os outros dois géis foi escolhido para a comparação com o gel do outro tratamento. Os valores de intensidade relativa foram utilizados para determinar as variações na expressão dos “spots”

protéicos, sendo estas consideradas válidas para “spots” com aumento ou diminuição nos valores de intensidade de pelo menos duas vezes.

2.4.5. Digestão triptica “in-gel”

Após as análises dos géis bidimensionais, as proteínas de interesse foram retiradas dos géis preparativos com o auxílio de um bisturi e transferidas para tubos de microcentrífuga, onde foi realizada a digestão com tripsina, segundo o método descrito por Shevchenko *et al.* (2006). Os pedaços de géis (1 mm²) contendo os “spots” selecionados foram descorados com solução de bicarbonato de amônio a 25 mM em acetonitrila a 50%, pH 8,8. Para remoção completa do corante e do SDS, foram realizadas três lavagens com 300 µL da solução descorante. Os tubos foram mantidos sob agitação constante por 15 min à temperatura ambiente em cada lavagem. Na segunda lavagem os pedaços géis permaneceram em contato com a solução descorante por uma noite. Após a remoção da solução descorante, os pedaços de géis foram desidratados duas vezes com 200 µL de acetonitrila a 100% por 5 min. A remoção da acetonitrila e a secagem dos géis foram feitas por 5 min em liofilizador. Em seguida, os pedaços de géis foram reidratados, por 45 min a 4 °C, com 20 µL do tampão de digestão contendo bicarbonato de amônio a 40 mM em acetonitrila a 10% e tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin*, Promega) na concentração de 20 ng.µL⁻¹. Após a adição de 50 µL da solução de bicarbonato de amônio a 40 mM em acetonitrila a 10%, a digestão das amostras foi realizada por uma noite a 37 °C. Posteriormente, os peptídeos foram extraídos dos géis com 30 µL de solução de ácido fórmico a 5% em acetonitrila 50%, por três vezes, com auxílio de um sonicador (UltraCleaner 1400A, Unique). As amostras foram transferidas para microtubos limpos, concentradas até cerca de 10 µL em uma centrífuga a vácuo (SpeedVac SVC100H, Savant, USA) e, então armazenadas em freezer -80 °C para posterior análise por espectrometria de massas.

2.4.6. Espectrometria de massas e identificação das proteínas

Os peptídeos da digestão triptica foram analisados por espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray, acoplada a cromatografia líquida (LC-ESI-MS/MS). As análises foram conduzidas em um sistema de cromatografia líquida (*Nano-high-performance*, UPCL) acoplado a um espectrômetro de massas híbrido de alta resolução (Q-TOF), com dois analisadores de massa, um quadrupolo (Q) e um analisador por tempo de voo (TOF - *Time-of-flight*) (Waters Corp., Milford, MA, USA). Os dados brutos obtidos, resultantes dos experimentos de LC-MS/MS, foram processados usando o programa Protein Lynx versão 2.0 (Waters Corp., MA, USA) e convertidos em arquivos de texto contendo as massas e intensidades dos peptídeos detectados (*peak list*) para pesquisa no banco de dados.

Os dados de PMF (*peptide mass fingerprint*) e MS/MS, obtidos do ESI-Q-TOF, foram submetidos ao programa de busca MASCOT Daemon (Matrix Science, London, UK). A busca utilizou como banco de dados o NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) não-redundante, restringido para Viridiplantae (Green Plants). Todos os peptídeos foram assumidos como sendo monoisotópicos e protonados $[M+H]^+$. Os outros parâmetros de busca foram variação da massa do peptídeo de $\pm 1,2$ Da, um sítio perdido de clivagem da tripsina, cisteínas modificadas por carbamidometilação e oxidação parcial da metionina. Os resultados encontrados foram avaliados segundo os seguintes critérios: mínimo de três peptídeos pareados, “scores” das proteínas dado pelo MASCOT ($p < 0,05$) e mínimo de 10% de cobertura da sequência da proteína pelos peptídeos pareados. As proteínas identificadas foram comparadas às massas moleculares e pontos isoelétricos dos “spots” em análise. Para as proteínas identificadas, as localizações subcelulares foram determinadas pelo programa TargetP (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/), enquanto as vias metabólicas e funções biológicas que as proteínas estão envolvidas foram pesquisadas no Uniprot (www.uniprot.org/).

2.5- Delineamento experimental e análise estatística

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado com um arranjo fatorial 2 x 3, correspondendo a duas cultivares (Pitiúba e TVu) e três tratamentos (controle, estresse salino e recuperação) com cinco repetições, totalizando 30 parcelas experimentais. A parcela experimental foi constituída por um vaso contendo duas plantas cada. As médias e os desvios padrões foram calculados a partir das cinco repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo os valores médios comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando o programa Assistat versão 7.6 beta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Crescimento vegetativo

O estresse salino com NaCl a 75 mM causou um decréscimo na área foliar de ambos os cultivares de feijão de corda (Figura 1A). Em relação ao controle, as reduções na área foliar foram de 55% no cultivar Pitiúba e de 59% no cultivar TVu. Quando restabelecida as condições controle, os incrementos observados na área foliar, em relação às plantas estressadas, foram de 68 e 87% para o Pitiúba e TVu, respectivamente. De acordo com Munns e Termaat (1986) a redução no crescimento foliar é inicialmente regulada por sinais hormonais, especialmente envolvendo o ácido abscísico (ABA), o qual é produzido nas raízes e transportado via xilema até as folhas como resposta à diminuição do potencial osmótico do solo. Posteriormente, a redução no crescimento foliar seria devido ao acúmulo excessivo de íons tóxicos no citosol das células foliares. De outra forma, o acúmulo de sais no apoplasto pode causar a desidratação das células e inibir a expansão dos tecidos foliares (MUHLING; LAUCHLI, 2002).

A produção de matéria seca foi reduzida drasticamente pela salinidade, especialmente na parte aérea, embora não tenha havido diferença significativa entre os cultivares estudados,

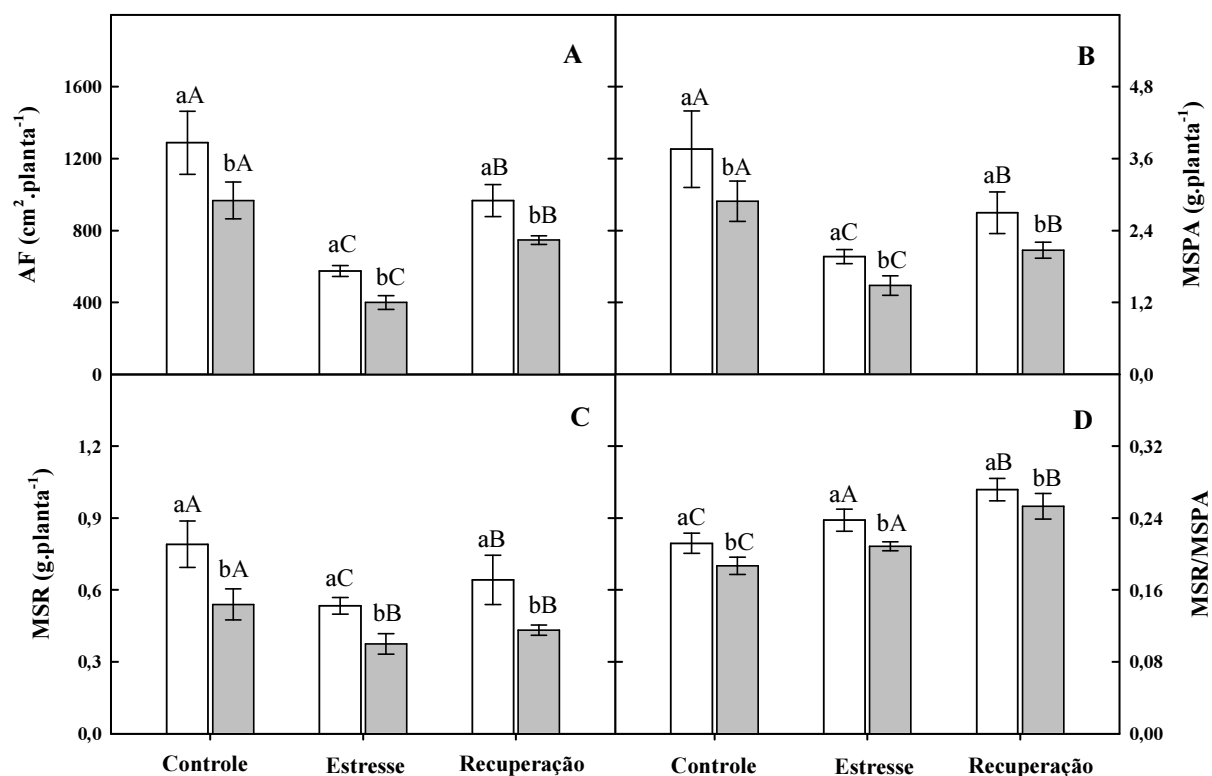


Figura 1. Área foliar (AF, A), matérias secas da parte aérea (MSPA, B), das raízes (MSR, C) e relação MSR/MSPA (D) de plantas de feijão de corda, cultivares Pitiúba (\square) e TVu (\blacksquare), sob condições controle, de estresse salino (NaCl a 75 mM) e após 5 dias de recuperação na ausência de sal. As barras verticais representam a média \pm o desvio padrão de cinco repetições. Letras minúsculas diferentes entre cultivares em um mesmo tratamento, e maiúsculas diferentes entre tratamentos em um mesmo cultivar, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

controle foram retomadas, a matéria seca da parte aérea aumentou 36% no Pitiúba e 40% no TVu, em relação às plantas sob estresse salino. Nas raízes, a produção de biomassa foi reduzida por 33% no Pitiúba e por 31% no TVu, em relação ao controle (Figura 1C). Os incrementos no crescimento das raízes dos cultivares Pitiúba e TVu foram de 21 e 16%, respectivamente, após o período de recuperação. Estes resultados não corroboram com o fato de que esses cultivares possuem tolerância diferenciada ao estresse salino. No entanto, é importante salientar que, além dos fatores intrínsecos da planta e do ambiente, o grau com que a salinidade afeta o crescimento das plantas depende de fatores relacionados com o estresse, entre eles, a intensidade, a duração e a forma de aplicação do estresse (BRAY *et al.*, 2000). Em adição, no experimento mais detalhado de análise de crescimento realizado por Praxedes *et al.* (2010) foi possível observar que as taxas de assimilação líquida e de crescimento, bem como a biomassa total foram menores no cultivar TVu, sendo que as maiores diferenças entre os cultivares ocorreram somente com 17 dias do início do estresse salino. Resultados semelhantes foram observados por Costa *et al.* (2003), comprovando a maior sensibilidade do cultivar TVu à salinidade.

Com relação à razão MSR/MSPA, os dados obtidos mostraram que o decréscimo mais acentuado na MSPA, quando comparado ao da MSR, bem como a menor recuperação das raízes em relação à parte aérea no período pós-estresse, resultaram em um aumento nesse parâmetro durante e após o estresse salino (Figura 1D). Portanto, como observado para muitas espécies sob estresse com NaCl, a parte aérea foi mais afetada do que as raízes (CHARTZOULAKIS; KLAPAKI, 2000; GHOULAM, FOURSY; FARES, 2002; KAO *et al.*, 2006). Entretanto, após o período de estresse, a recuperação da matéria seca da parte aérea, em particular da área foliar, foi maior do que a das raízes, indicando ser uma resposta adaptativa para evitar a perda de água através da transpiração (GREENWAY; MUNNS, 1980).

3.2- Relações hídricas das plantas

O teor relativo de água (TRA) nas folhas foi reduzido pela salinidade em ambos os cultivares, em média 10% em relação às plantas controle (Figura 2A). Contudo, durante o período de recuperação pós-estresse os valores do TRA foram aumentados em cerca de 14% no cultivar Pitiúba e 11% no cultivar TVu, ficando semelhantes ao do controle. O estresse osmótico causado pelas altas concentrações de sais na zona radicular reduz o potencial hídrico do solo e, conseqüentemente, a disponibilidade de água para a planta, resultando em desidratação a nível celular (MUNNS, 2002). Ao contrário do TRA, o potencial osmótico das folhas foi sempre menor no cultivar TVu do que no Pitiúba (Figura 2B). Sob condições de salinidade (NaCl 75 mM), este parâmetro foi reduzido em 55% no Pitiúba e 44% no TVu. A redução do potencial osmótico nos tecidos tem sido associada com a tolerância ao estresse salino em muitas espécies de plantas (HAJLAOUI *et al.*, 2010; PÉREZ-LÓPEZ *et al.*, 2009; SÁNCHEZ-BLANCO *et al.*, 1998). Como observado para os cultivares de feijão de corda, a redução do potencial osmótico pode ter contribuído para a manutenção do alto TRA nas folhas. Após o tratamento de recuperação, os valores do potencial osmótico se mantiveram próximos ao do controle, o que sugere a recuperação das plantas dos efeitos osmóticos dos sais.

3.3- Perfil eletroforético 2D durante o estresse salino e após recuperação

Em experimentos preliminares usando eletroforese 2D, diferenças significativas no perfil de proteínas das folhas dos cultivares Pitiúba e TVu foram observadas em 75 mM de NaCl (Experimento 1), a qual foi escolhida como dose de referência para os estudos proteômicos subsequentes. Assim, para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos com as respostas do feijão de corda ao estresse salino, foi realizada

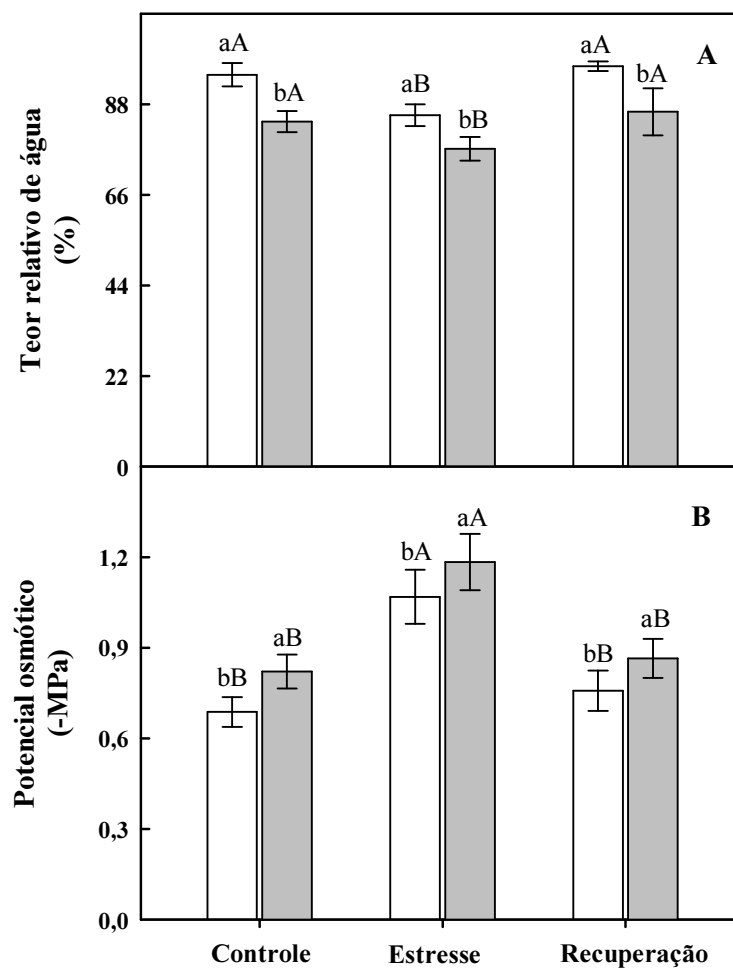


Figura 2. Teor relativo de água (A) e potencial osmótico (B) foliares de plantas de feijão de corda, cultivares Pitiúba (□) e TVu (■), sob condições controle, de estresse salino (NaCl a 75 mM) e após 5 dias de recuperação na ausência de sal. As barras verticais representam a média \pm o desvio padrão de cinco repetições. Letras minúsculas diferentes entre cultivares em um mesmo tratamento, e maiúsculas diferentes entre tratamentos em um mesmo cultivar, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

uma análise proteômica comparativa nas folhas das plantas sob condições controle, de estresse salino e daquelas que passaram por um período de recuperação do estresse.

Os resultados das análises das triplicatas dos géis, feitas no programa ImageMaster 2D Platinum, revelaram nas folhas do Pitiúba sob condições controle um total de 155 “spots” protéicos bem resolvidos na faixa de pH de 4 a 7, com massas moleculares entre 10,8 e 73,4 kDa (Figura 3). Entre os tratamentos controle e salino, a análise quantitativa das imagens mostrou que 21 “spots” protéicos tiveram expressão diferenciada. As alterações foram consideradas válidas somente quando os valores de intensidade relativa, obtidos no ImageMaster, variaram por pelo menos duas vezes ou devido ao aparecimento ou desaparecimento do “spot” em qualquer um dos tratamentos. Dessa forma, no Pitiúba, o estresse salino causou o aumento na expressão de 9 “spots” protéicos (spots 95, 100, 112, 118, 120, 185, 212, 230 e 233) e a diminuição em outros 12 (spots 93, 101, 105, 119, 121, 140, 149, 157, 179, 181, 184 e 189) (Figura 3). Em alguns casos, após o período de estresse, os efeitos do NaCl na expressão dos “spots” protéicos foram revertidos. Os principais “spots” protéicos diferencialmente expressos com as variações de intensidade relativa são mostrados na figura 4. Por exemplo, os spots 95, 100 e 185 tiveram seus níveis de expressão aumentados em 3,9, 2,3 e 2,7 vezes em condições de estresse, respectivamente, e foram reduzidos a níveis próximos ao do controle no período pós-estresse. Por outro lado, os “spots” 181 e 184 foram reduzidos pela salinidade em torno de 3,1 e 2,3 vezes, respectivamente, e aumentaram durante a recuperação do estresse. O “spot” 77 foi detectado somente em condições de salinidade, desaparecendo quase completamente quando as plantas retornaram às condições não salinas.

Um padrão consistente de 206 “spots” de proteínas, em média, com massas moleculares entre 11,3 e 69,7 kDa, foram detectados nos géis bidimensionais do cultivar TVu mantido em condições controle (Figura 5). Destes, 26 “spots” protéicos apresentaram mudanças na expressão devido à salinidade, sendo 14 aumentos (spots 57, 58, 60, 79, 80, 111,

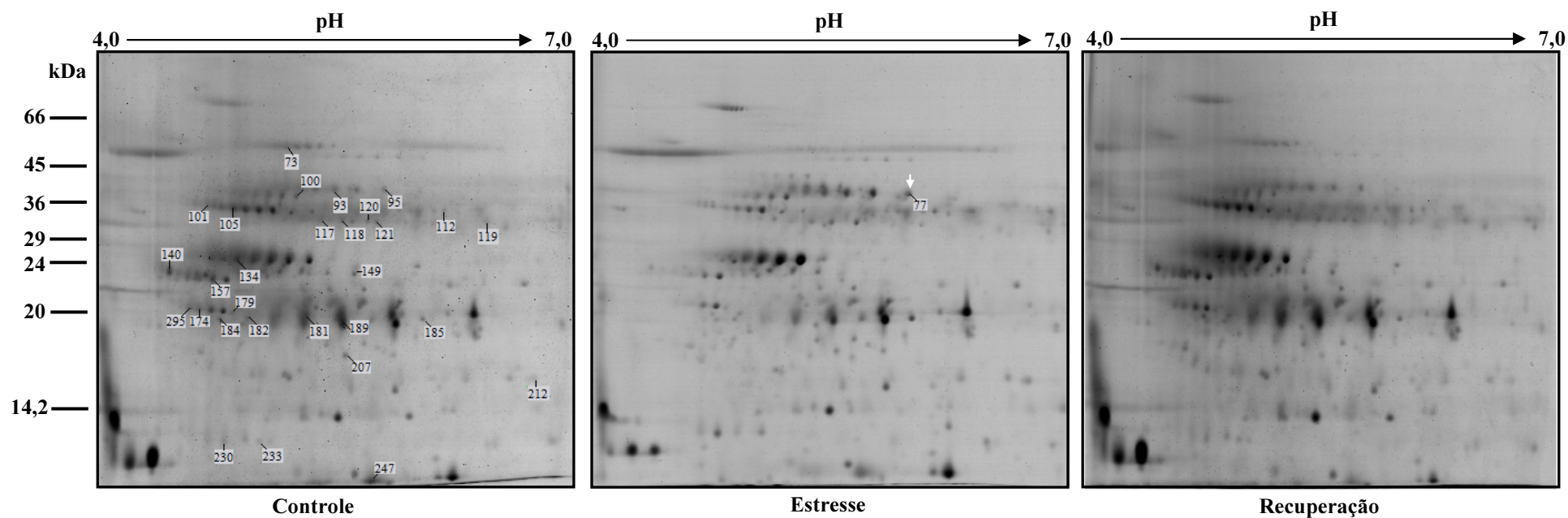


Figura 3. Géis eletroforéticos 2D mostrando os “spots” diferencialmente expressos (fator de variação > 2 vezes) em folhas de plantas de feijão de corda, cultivar Pitiúba, sob condições controle, de estresse salino com NaCl a 75 mM e após 5 dias de recuperação na ausência de sal. As principais mudanças nos “spots” são mostradas em detalhe na figura 4. A seta branca indica síntese *de novo*. Os mapas foram obtidos usando tiras de gel de 13 cm com gradiente de pH 4-7 na focalização isoeletrica e géis de poliacrilamida a 12,5% na SDS-PAGE. Em cada gel foram carregados 400 µg de proteínas, sendo os “spots” visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

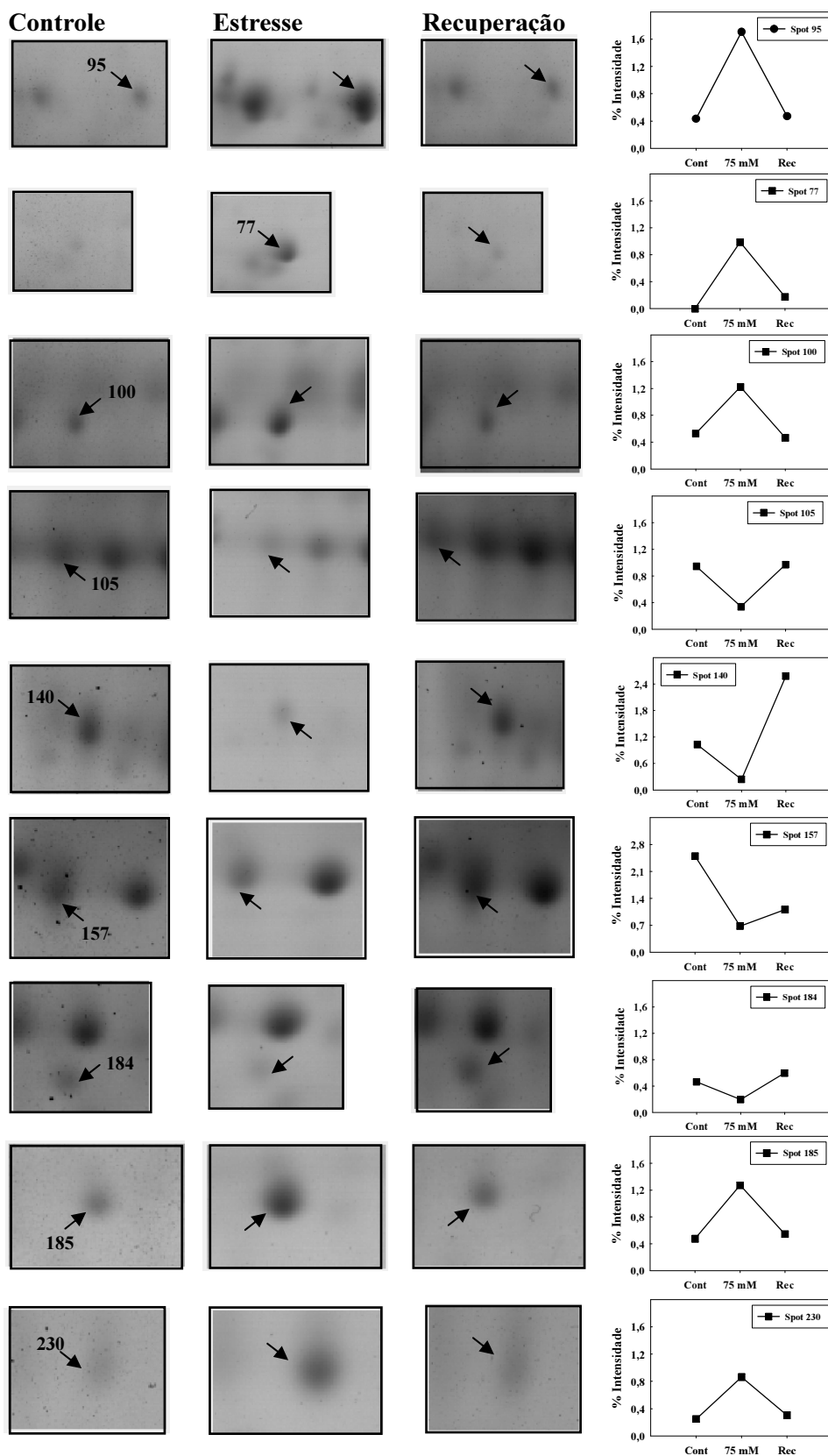


Figura 4. Detalhes dos “spots” marcados na figura 3 que foram diferencialmente expressos (fator de variação > 2 vezes) no cultivar Pitiúba sob condições controle, de estresse salino com NaCl a 75 mM e após 5 dias de recuperação na ausência de sal. As setas e números indicam os “spots” de interesse e os gráficos mostram os valores de intensidade em cada condição.

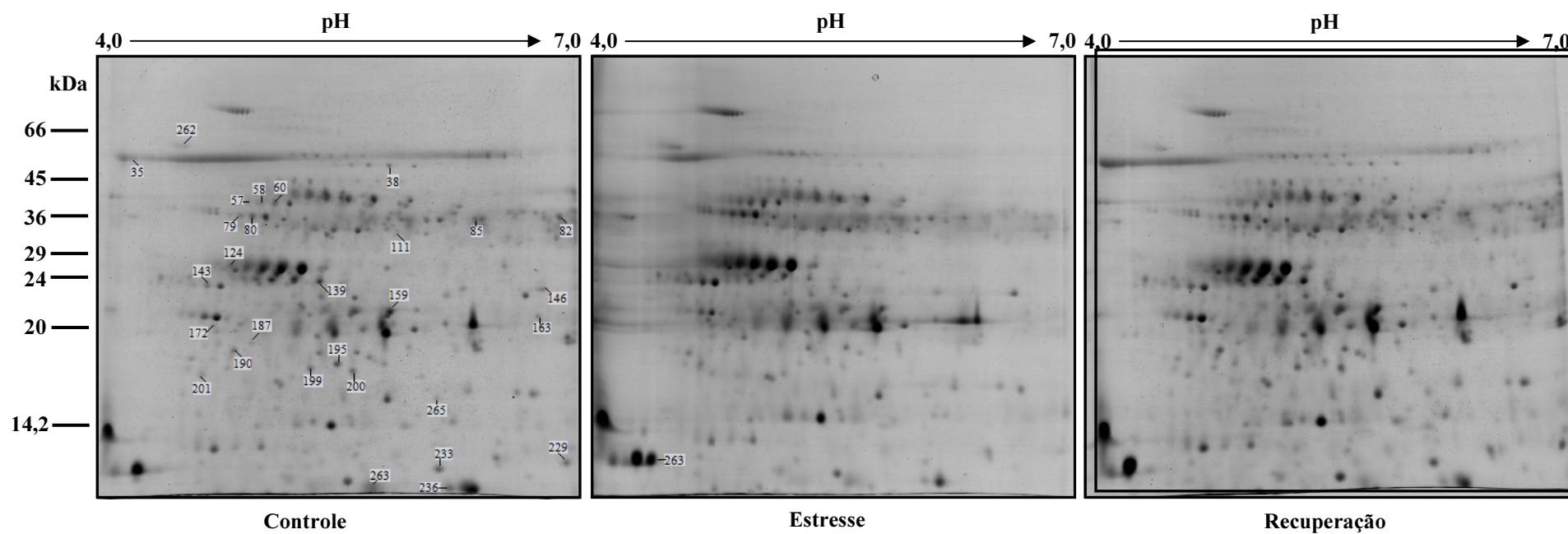


Figura 5. Géis eletroforéticos 2D mostrando os “spots” diferencialmente expressos (fator de variação > 2 vezes) em folhas de plantas de feijão de corda, cultivar TVu, sob condições controle, de estresse salino com NaCl a 75 mM e após 5 dias de recuperação na ausência de sal. As principais mudanças nos “spots” são mostradas em detalhe na figura 6. A seta branca indica síntese *de novo*. Os mapas foram obtidos usando tiras de gel de 13 cm com gradiente de pH 4-7 na focalização isoeletrica e géis de poliacrilamida a 12,5% na SDS-PAGE. Em cada gel foram carregados 400 µg de proteínas, sendo os “spots” visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

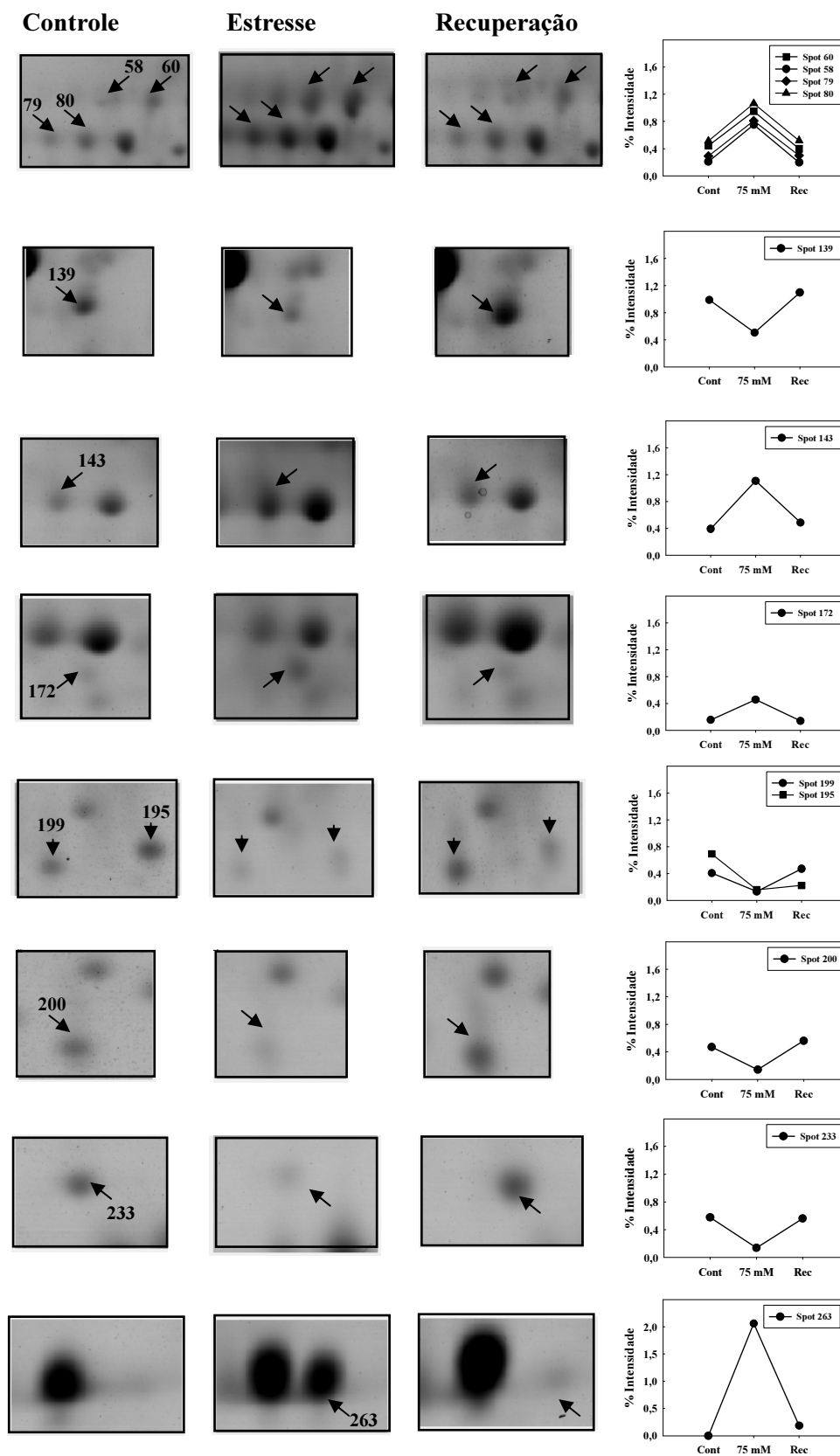


Figura 6. Detalhes dos “spots” marcados na figura 5 que foram diferencialmente expressos (fator de variação > 2 vezes) no cultivar TVu sob condições controle, de estresse salino com NaCl a 75 mM e após 5 dias de recuperação na ausência de sal. As setas e números indicam os “spots” de interesse e os gráficos mostram os valores de intensidade em cada condição.

124, 143, 172, 178, 187, 229, 232 e 236) e 12 diminuições (spots 38, 82, 139, 159, 163, 190, 195, 199, 200, 233, 263 e 265). Assim como observado no Pitiúba, alguns “spots” protéicos tiveram seus níveis de expressão restabelecidos nas plantas que passaram pelo período de recuperação. Os “spots” 79, 80 e 143, por exemplo, tiveram seus níveis de expressão aumentados pela salinidade em 2,8, 2,1 e 2,8 vezes, respectivamente, sendo reduzidos após retorno das plantas às condições controle (Figura 6). Em contraste, as expressões dos “spots” protéicos 139, 195 e 199 foram reduzidas pelo estresse em 2,0, 4,3 e 3,0 vezes, respectivamente, e aumentaram no período pós-estresse. O estresse salino também induziu a síntese *de novo* do “spot” 263, o qual desapareceu novamente após o período de recuperação (Figura 6).

Durante o processo de aclimação ao estresse salino, as plantas requerem energia extra para restabelecer a homeostase. De acordo com Kosová *et al.* (2011), isto significa um redirecionamento do metabolismo vegetal a partir do crescimento e desenvolvimento ativos para a aclimação ao estresse. Esta mudança profunda no metabolismo devido à salinidade é refletida também no proteoma. Recentemente, mudanças no perfil de proteínas têm sido observadas em muitas espécies vegetais sob condições de salinidade. A análise proteômica comparativa em raízes de duas variedades de trigo (*Triticum durum* L.) com tolerância diferencial à salinidade, mostrou um aumento na síntese de um polipeptídeo de 26 kDa, o qual foi mais evidente na variedade tolerante sob 200 mM de NaCl (MAJOUL *et al.*, 2000). A exposição de duas espécies de gramíneas (*Paspalum vaginatum* e *Eremochloa ophiuroides*) ao estresse salino com NaCl a 300 mM causou alterações no padrão de proteínas das raízes, sendo a maior tolerância de *P. vaginatum* relacionada com a expressão diferencial de algumas proteínas de defesa contra o estresse oxidativo (LIU *et al.*, 2012). Em folhas de dois genótipos de soja (*Glycine max* L.) diferindo na tolerância ao sal, Ma *et al.* (2012) observaram 91 proteínas com níveis de expressão alterados pela salinidade (100 mM de NaCl).

No presente estudo, embora alguns “spots” de proteínas tenham tido seus níveis de expressão recuperados após o estresse salino (Figuras 4 e 6), a análise comparativa entre os géis 2D das plantas controle e daquelas do período pós-estresse revelou mudanças na expressão de algumas proteínas em ambos os cultivares. No Pitiúba, um total de 11 “spots” apresentaram diferenças de expressão, em relação ao controle, após a recuperação do estresse, sendo observados 7 aumentos (spots 117, 118, 134, 140, 182, 207 e 247) e 5 diminuições (spots 119, 157, 174, 189 e 295) (Figura 3). Já no TVu, um total de 8 “spots” tiveram seus níveis de expressão alterados após o período de recuperação. Destes, 3 aumentaram (spots 35, 201 e 262) e 5 diminuíram (spots 85, 146, 195, 236 e 265) em relação ao controle (Figura 5).

Vários estudos, principalmente sob condições de estresse hídrico, têm revelado a capacidade de reajuste das plantas após o período de estresse por meio de mudanças no proteoma (GAZANCHIAN *et al.*, 2007; INGLE *et al.*, 2007). A análise do perfil de proteínas em folhas de azinheiras (*Quercus ilex*), por exemplo, revelou alterações no padrão de expressão de 23 proteínas quando as plantas foram submetidas aos tratamentos de estresse hídrico e de recuperação (ECHEVARRÍA-ZOMEÑO *et al.*, 2009). Nesse estudo, os autores puderam observar a maior flexibilidade e capacidade de reação das proteínas fotossintéticas (complexo de evolução do O₂) em relação às da via glicolítica (triose-fosfato isomerase), pois ambas foram reduzidas em condições de estresse, mas somente as proteínas relacionadas com a fotossíntese tiveram seus níveis de expressão recuperados após o período de reidratação. Apesar de tudo, estudos proteômico que avaliam as respostas das plantas durante e após o período de estresse salino são escassos. Utilizando esta abordagem, um estudo mostrou que a recuperação de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) após quatro dias de estresse salino foi acompanhada pela degradação de proteínas LEA que haviam sido induzidas pelo sal (CHOUREY; RAMANI; APTE, 2003). Segundo os autores, a síntese e acúmulo de proteínas

LEA durante o estresse foi essencial para a preservação estrutural e funcional das atividades celulares, ajudando na recuperação posterior das plantas que retomaram o crescimento.

3.4- Proteínas identificadas

Os “spots” protéicos que apresentaram as maiores alterações de expressão entre os tratamentos foram selecionados e submetidos à digestão trípica, sendo os peptídeos resultantes analisados por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF MS). Para cada cultivar, 11 “spots” protéicos diferencialmente expressos foram selecionados: “spots” 77, 93, 95, 100, 140, 149, 157, 184, 185, 212 e 230 no Pitiúba; e “spots” 60, 79, 80, 139, 143, 163, 172, 195, 199, 262 e 263 no TVu. No cultivar Pitiúba (tolerante), também foram selecionados para identificação 8 “spots” (160, 176, 208, 211, 223, 224, 241 e 243) que mantiveram suas taxas de expressão ou não a alteraram por pelo menos 2 vezes em relação ao controle, durante e após o estresse salino.

Para algumas espécies, incluindo *V. unguiculata*, a ausência de sequências de DNA genômico no banco de dados leva a uma baixa percentagem de identificação de proteínas. Nesses casos, a espectrometria de massas em tandem (MS/MS) e a identificação com espécies relacionadas tornam-se necessárias. Assim, no presente estudo, 80% dos “spots” selecionados foram identificados através de pesquisas no banco de dados do NCBI usando o programa MASCOT (Tabela 1). Para algumas proteínas que não foram identificadas prontamente no MASCOT, a utilização do banco de EST's (*expressed sequence tags*) de *Vigna unguiculata*, com 189.593 sequências depositadas no NCBI até setembro de 2012, possibilitou a identificação.

Tabela 1. Proteínas identificadas de folhas de plantas de feijão de corda sob estresse salino (NaCl a 75 mM) e após o período de recuperação. Os “spots” obtidos por eletroforese 2D foram identificados por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF).

Nº <i>spot</i> cultivar	Proteína [Espécie]	Nº de acesso (NCBI)	Sequência dos peptídeos (MS/MS)	Cobertura da sequência (%)	Mowse Score*	Processo biológico (localização)	pI/MM (kDa) Teórico	pI/MM (kDa) Experimental
77** Pitiúba	Ativase da Rubisco [<i>Vigna unguiculata</i>]	gi 149941202	TYNFDNMK DGYIAPAFMDK NFMTLPNIK VPLILGIWGGK SFQCELVFAK MGINPIVMSAGELESGNAGEPAK MCALFINDL DAGAGR VPIIVTGND FSTLYAPLIR FYWAPTR TDGVP EEEVTK LVDTFPGQSIDFFGALR VYDDEVR	59	686	Ativação da Rubisco (cloroplasto)	8,31/27,95	5,99/37,09
93** Pitiúba	Ativase da Rubisco [<i>Vigna unguiculata</i>]	gi 149941202	TYNFDNMK DGYIAPAFMDK NFMTLPNIK VPLILGIWGGK SFQCELVFAK MGINPIVMSAGELESGNAGEPAK MCALFINDL DAGAGR LGGTTQYTVN NQMVNATLMNIADNPTNVQLPG-- -MYNK VPIIVTGND FSTLYAPLIR FYWAPTR TDGVP EEEVTK LVDTFPGQSIDFFGALR VYDDEVR VYDDEVRK	74	794	Ativação da Rubisco (cloroplasto)	8,31/27,95	5,23/55,20

Tabela 1. (Continuação)

95** Pitiúba	Ativase da Rubisco [<i>Vigna unguiculata</i>]	gi 149941202	TYNFDNMK TYNFDNMKDGYYIAPAFMDK DGYYIAPAFMDK NFMTLPNIK VPLILGIWGGK SFQCELVFAK MGINPIVMSAGELESGNAGEPAK EAADIKK MCALFINDLDAGAGR YREAAIIK LGGTTQYTVNNQMVNATLMNIADNPTNVQLPG-- -MYNK VPIIVTGNDFSTLYAPLIR FYWAPTR TDGVPEEEVTK LVDTFPGQSIDFFGALR VYDDEV VYDDEVK	78	925	Ativação da Rubisco (cloroplasto)	8,31/27,95	5,46/55,22
100** Pitiúba	Ribulose-5-fosfato quinase [<i>Glycine max</i>]	gi 356495988	LTSVFGGAAEPPK GGNPDSNTLISDTTIVICLDDYHSLDR ANDFDLMYEQVK DGIAVEKPIYNHVTGLLDPPPELIKPPK ILVIEGLHPMFDSR KPDFEAYIDPQK QYADAVIEVLPTQLIPDDNEGK KLTCSYPGIK LDELIYVESHLNLSTK FYGEVTQQMLK HADFPGSNNGTGLFQTIVGLK	45	571	Fotossíntese (cloroplasto)	5,89/45,24	5,88/50,16

Tabela 1. (Continuação)

140** Pitiúba	Vicilina [<i>Vigna unguiculata</i>]	gi 160332746	AILTLVNPDGR QIQNLENYR GEANIELVGQR EGLLMPNYNSK DSYILEQGHAQK GQNNPFYFSDR LHEITPEKNPQLR EQQQQQEESWEVQR FQDFFLSSTEAQQSYLQGFSSK NFLAGEEDNVMSEIPTEVLDVTFPASGEK	33	502	Reserva energética	5,35/49,65	4,41/22,34
149** Pitiúba	Precursor de Lectina [<i>Vigna unguiculata</i>]	gi 41059971	AFYSAPIK IWDSTTGK SNSADGLAFALVPVGSEPK HIGIDVNSIESIR TSYIVSER	19	248	Ligação a carboidratos	5,61/30,06	5,59/22,15
157** Pitiúba	Desconhecida [<i>Glycine max</i>]	gi 255639045	VPFLFTIK GASTGYDNAVALPAGGR TKPETGEVIGVFESVQPSDTDLGAK	29	190		4,74/18,11	4,69/21,85
160 Pitiúba	Desconhecida [<i>Lotus japonicus</i>]	gi 388491410	IGGADDVFIGDIR MKPGFDPTK GGRPEFYFDDGAYPEQVDWIGQK KAEQYLADSGIPYTHIRPGLLDK DDELLQTETK AFDLASKPEGVGTPTK	38	283		6,63/26,96	6,69/20,43
176 Pitiúba	Provável ribose-5-fosfato isomerase [<i>Glycine max</i>]	gi 356505937	SLGIPLSVLDDNPR LDLAIDGADEVDPDLNLVK LVDGLGGSLAMPVEVVQFCWK YNLDR	21	237	Metabolismo dos carboidratos	5,50/29,76	4,74/19,55

Tabela 1. (Continuação)

184** Pitiúba	Subunidade β da sintase do ATP [<i>Portulaca grandiflora</i>]	gi 14718191	IVGEEHYETAQR GIYPAVDPLDSTSTMLQPR ELQDIIAILGLDELSEEDR MPSAVGYQPTLSTEMGSLQER YKELQDIIAILGLDELSEEDR ELQDIIAILGLDELSEEDRITVAR EGSITSIQAVVYPADDLTDPAATTFAHLDATT-VLSR	30	423	Produção de energia	4,99/41,18	4,73/19,24
185** Pitiúba	Proteína 2 do complexo de evolução do oxigênio [<i>Glycine max</i>]	gi 356526942	TNTDFLPYNGDGFK EVEYPGQVLR SITDYGSPEEFLSQVDYLLGK QAFFGQTDAEGGFDSNAVATANILESSTPVIDGK	30	80	Fotossíntese (cloroplasto)	6,96/28,21	5,86/16,74
208 Pitiúba	Provável peptidil prolil cis-trans isomerase 2 do tipo FKBP [<i>Glycine max</i>]	gi 356538867	GQPYIFR GLTSAPGRPR LYIPGSLAFP VGQGPSPPIGFQVAANYVAMVPSGQIFDSSL EK	26	155	Chaperona (cloroplasto)	6,40/24,59	5,21/15,78
211 Pitiúba	Subunidade Fe-S do complexo citocromo b_6-f [<i>Glycine max</i>]	gi 356549980	GDPTYLVVEK FICPCHGSQYNDQGR GPAPLSLALAHCDIDDGK VVFVPWVETDFR	24	216	Fotossíntese	8,69/24,16	6,59/15,72
212** Pitiúba	Desconhecida [<i>Medicago truncatula</i>]	gi 388496642	DFMIQGGDFDKGNGTGGK TPWLDQR HVVFQVLEGMIDIVR LIESQETDRGDRPLK	22	190	Chaperona (cloroplasto)	9,66/26,17	6,73/15,68
224 Pitiúba	Dismutase do superóxido Cu/Zn [<i>Glycine max</i>]	gi 356539366	ALVVHELEDDLK GTSAVEGVATLIQEDDGPTTVSVR HAGDLGNIVANAEGVAEATIVDNQIPLSGPNSVV-GR	35	260	Metabolismo do radical superóxido (cloroplasto)	6,03/20,87	5,43/14,32

Tabela 1. (Continuação)

60** TVu	Ribulose-5-fosfato quinase [<i>Glycine max</i>]	gi 356495988	RLTSVFGGAAEPPK LTSVFGGAAEPPK GGNPDSNTLISDTTIVICLDDYHSLDR EKGVTALDPR ANDFDLMYEQVK DGIAVEKPIYNHVTGLLDPPPELIKPPK ILVIEGLHPMFDSR GHSLESIK KPDFEAYIDPQK QYADAVIEVLPTQLIPDDNEGK KLTCYPGIK LTCSYPGIK LDELIYVESHLNLSTK FYGEVTQQMLK HADFPGSNNGTGLFQTIVGLK	50	823	Fotossíntese (cloroplasto)	5,89/45,24	5,06/46,20
79** TVu	Sedoheptulose 1,7- bisfosfatase isoforma 1 [<i>Glycine max</i>]	gi 356539931	LLVSMGEALR TTYVLALK LFSPGNLR LIDYYVNEK YTGGMVPDVNQUIVK FEETLYGK	14	242	Metabolismo dos carboidratos (cloroplasto)	5,86/41,80	4,83/33,37
80** TVu	Fator HCF136 de estabilidade e montagem do fotossistema 2 [<i>Glycine max</i>]	gi 356544404	SIPSAEDEDNFYR IPLSAELPGDMVYIK AAVQETVSATLNR ADGGLWLLVR GFGILDVGYR AADNIAANLYSVK GFVLGNDGVLLR	21	353	Fotossíntese (cloroplasto)	6,79/43,28	4,91/33,26

Tabela 1. (Continuação)

139** TVu	Proteína 1 do complexo de evolução do oxigênio [<i>Glycine max</i>]	gi 356559442	KLCLEPTSFTVK LCLEPTSFTVK NAPLEFQNTK FEEKDGIDYAAVTVQLPgger DGIDYAAVTVQLPgger VPFLFTIK GASTGYDNAVALPAGGR GASTGYDNAVALPAGGRGDEEELAK GDEEELAK GDEEELAKENNK ITLSVTK TKPETGEVIGVFESVQPSDTDLGAK	33	691	Fotossíntese (cloroplasto)	6,66/35,03	4,60/19,32
163** TVu	Anidrase carbônica [<i>Phaseolus vulgaris</i>]	gi 270342124	GDMAK VCPSHVLDVDFQGEAFVVR NVANIVPPYDQSK EAVNVSLGNLLTYPFVR YSGTGAAIEYAVLHLK	20	224	Fotossíntese (cloroplasto)	8,09/35,56	6,77/19,87
172** TVu	Subunidade β sintase do ATP [<i>Sarracenia flava</i>]	gi 7708638	KTGCIVQIIGPVLVDVAFRPGK MPSAVGYQPTLSTEMGSLQER EGSITSIQAVYVPADDLTDPAATTFAHLDATTVL SR GIYPAVDPLDSTSTMLQPR IVGEEHYETAQR	22	331	Produção de energia	5,28/51,75	4,88/16,56
195** TVu	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase – subunidade maior [<i>Polhillia pallens</i>]	gi 125991555	DTDILAAFR VTPQPGVPPEEAGAAVAAESSTGTWTTVWTDGL- -TSLDR MFTSIVGNVFGFK TFQGGPHGIQVER	17	299	Fotossíntese (cloroplasto)	6,34/47,22	5,46/16,23

Tabela 1. (Continuação)

199** TVu	Proteína estabilizante - II contendo Mn [<i>Solanum tuberosum</i>]	gi 239911810	RLTFDEIQSK LTFDEIQSK GTGTANQCPTIDGGVDSFAFKPGK LTYTLDEIEGPFVSPDGTVK LTYTLDEIEGPFVSPDGTVKFEK FEEKDGIDYAAVTVQLPGER DGIDYAAVTVQLPGER VPFLFTIK QLVASGKPEFSGDFLVPSYR	35	456	Fotossíntese (cloroplasto)	6,45/31,21	5,29/16,18
262** TVu	Calreticulina [<i>Glycine max</i>]	gi 356575355	GIQTSYR FYAISAQYPEFSNK FYAISAQYPEFSNKDK LDCGGGYMK FGGDTYPSIMFGPDICGYSTK APLIDNPDFKDDPDLYVFPNLK YVGIELWQVK QLAEETWGK	22	279	Transdução de sinal	4,47/48,47	4,51/48,23
223 Pitiúba	Não identificado							
230** Pitiúba	Não identificado							
241 Pitiúba	Não identificado							
243 Pitiúba	Não identificado							
143** TVu	Não identificado							
263** TVu	Não identificado							

* Mowse Score é a probabilidade estatística calculada pelo MASCOT de identificação positiva da proteína predita. Scores > 50 contra o NCBI indicam extensa identidade ou homologia ($p < 0,05$). ** “Spots” diferencialmente expressos em relação ao controle mostrados nas figuras 3, 4, 5 e 6.

3.5- Proteínas com expressão diferenciada no cultivar Pitiúba

No cultivar Pitiúba, várias proteínas associadas com a fotossíntese mostraram expressão diferenciada nas folhas sob estresse salino. Duas isoformas da ativase da Rubisco (“spots” 77 e 95) aumentaram suas expressões em condições de estresse, sendo a isoforma do “spot” 77 detectada somente durante o período de estresse (Figura 4). A ativase da Rubisco (EC 4. 1. 1. 39) funciona na regulação da atividade da Rubisco, removendo, via hidrólise do ATP, açúcares fosfatos inibitórios (p. ex. ribulose-1,5-bifosfato) do sítio ativo da Rubisco, de forma que o CO₂ possa ativar a enzima através da carbamilação (KANG *et al.*, 2012). Portanto, o aumento observado no conteúdo de algumas isoformas dessa enzima visa a manutenção da assimilação de CO₂ em condições de estresse salino. Em plantas de *Suaeda salsa* adaptadas à salinidade, o aumento na taxa de assimilação de CO₂ nessas condições foi relacionado com a indução da ativase da Rubisco (LI *et al.*, 2011). Por outro lado, em plantas de algodão (*Gossypium herbaceum* L.) sob estresse hídrico, foi verificada uma redução na expressão da ativase da Rubisco (DEEBA *et al.*, 2012). No presente estudo, também foi verificada a redução na expressão de uma isoforma da ativase da Rubisco no “spot” 93, indicando que a regulação dessa enzima pode variar dependendo da isoforma. Corroborando com estes resultados, Kang *et al.* (2012) mostraram, em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.), a indução de duas isoformas da ativase da Rubisco e a redução na expressão de outras duas sob condições de salinidade. Em adição, esta proteína tem mostrado respostas diferentes dependendo do tipo de estresse (KOSOVÁ *et al.*, 2011).

A enzima ribulose 5-fosfato quinase (Ru5PK) ou fosforibuloquinase (EC 2. 7. 1. 19) foi identificada no “spot” 100 dos géis controle do Pitiúba. Essa enzima catalisa a fosforilação dependente de ATP da ribulose-5-fosfato para formar a ribulose-1,5-bisfosfato, um passo chave no ciclo de Calvin. No presente estudo, o estresse salino causou um aumento de 2,3 vezes na expressão desta enzima nas folhas do cultivar Pitiúba, sendo que, no período pós-

estresse, o nível de expressão do controle foi restabelecido (Figura 4). Estes resultados sugerem a capacidade desse cultivar em manter a taxa de regeneração da ribulose-1,5-bisfosfato e, portanto, de assimilação do CO₂ em condições de estresse salino. Vários estudos têm mostrado modificações no conteúdo da ribulose 5-fosfato quinase em condições de estresse (DEEBA *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2011; MA *et al.*, 2012). Xu e Huang (2010), estudando as respostas proteômicas ao estresse hídrico induzido por polietilenoglicol (PEG), verificaram reduções na expressão da ribulose 5-fosfato quinase tanto no cultivar tolerante (20,5%) quanto no sensível (51,1%) da espécie *Agrostis stolonifera*.

A subunidade β da sintase do ATP (EC 3. 6. 3. 14) foi identificada no “spot” 184, onde mostrou uma redução na expressão de cerca de 2,3 vezes em relação ao controle devido ao estresse salino (Figura 4). A sintase do ATP está localizada na membrana dos tilacóides, sendo a principal enzima de produção do ATP na presença de um gradiente eletroquímico de prótons transmembrana, o qual é gerado pelos complexos de transporte de elétrons. A expressão diferencial da sintase do ATP tem sido relatada em vários estudos proteômicos com outras espécies sob estresse salino, os quais indicam que a resposta da enzima pode variar dependendo da espécie, do tipo e da intensidade do estresse (CARUSO *et al.*, 2008; GUO *et al.*, 2012; RAZAVIZADEH *et al.*, 2009; SWAMI *et al.*, 2011). Por exemplo, na espécie *Suaeda salsa*, LI *et al.* (2011) observaram uma indução na produção da subunidade β da sintase do ATP em condições de estresse salino, mas não durante o estresse de choque térmico ou mesmo durante a combinação desses estresses. Sobhanian *et al.* (2010), por sua vez, verificaram reduções na expressão da sintase do ATP em folhas de soja (*Glycine max*) submetidas à salinidade. Por outro lado, Yang *et al.* (2012) não encontraram mudanças nos níveis de expressão desta enzima em cultivares de melancia sob estresse salino. Embora o papel da sintase do ATP nas respostas aos diferentes tipos de estresses permaneça incerto, alguns autores sugerem que a indução dessa proteína pode refletir a demanda de energia

requerida para os processos de aclimação aos sais como, por exemplo, os mecanismos de transporte secundário de íons (DU *et al.*, 2010).

Outra proteína relacionada com a fotossíntese que teve sua expressão alterada pelo estresse salino no Pitiúba foi a proteína 2 do complexo de evolução do oxigênio (CEO2), a qual mostrou um aumento de expressão em torno de 2,6 vezes no “spot” 185 (Figura 4). Resultados semelhantes foram observados por Ma *et al.* (2012) que, trabalhando com dois genótipos de soja (*Glycine max*) diferindo na tolerância ao sal, observaram um aumento na expressão da CEO2 apenas no genótipo tolerante (Lee 68). Em adição, a análise proteômica em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas ao estresse hídrico mostrou um aumento na expressão da CEO2 nas folhas, indicando sua participação no processo de aclimação das plantas ao estresse (ALI; KOMATSU, 2006).

A proteína vicilina foi identificada no “spot” 140 dos géis de folhas do cultivar Pitiúba sob condições controle (Figura 3). A salinidade reduziu a expressão dessa proteína por 4,3 vezes em relação ao controle, mas após o período de recuperação do estresse, houve um aumento na expressão da vicilina nesse cultivar, a níveis superiores ao das plantas controle (Figura 4). A vicilina é uma proteína pertencente à classe das globulinas 7S que tem como função servir de reserva energética em sementes, como verificado em muitas espécies de leguminosas (GOMES *et al.*, 1997; SALES *et al.*, 1996). Apesar disso, a expressão dos genes que codificam esta proteína em folhas foi evidenciada pela utilização da ferramenta BLAST no NCBI. O alinhamento da sequência da proteína contra o banco de EST's (*expressed sequence tags* - sequências curtas de genes obtidas a partir de bibliotecas de cDNA) para *Vigna unguiculata*, permitiu a identificação de EST's obtidas a partir de tecidos meristemáticos de folhas, caules e raízes (acessos GenBank: FF544727.1; FF539256.1; FF543920.1; FF543499.1; FF552345.1).

No cultivar Pitiúba foi identificada uma proteína desconhecida de *Medicago truncatula* (Fabaceae) no “spot” 212 (Figura 3, Tabela 1). No entanto, efetuando-se uma nova busca com o MASCOT no banco de dados de EST's de plantas e, após anotação do gene em *V. unguiculata*, foi possível obter uma proteína com 82% de identidade com a proteína peptidil prolil cis-trans isomerase de soja (*Glycine max*; acesso: XM_003556535) (Figura 7). Uma análise no programa TargetP indicou que, aparentemente, essa proteína é endereçada para o cloroplasto, onde é processada. Após localização das sequências sinalizadoras obtidas no ChloroP, a sequência da proteína madura apresentou pI teórico de 6,35 e massa molecular teórica de 19,83 kDa, valores muito próximos dos obtidos experimentalmente (Tabela 1).

A enzima peptidil prolil isomerase (EC 5. 2. 1. 8), também conhecida como PPIase, catalisa a interconversão dos isômeros cis e trans de ligações peptídicas com o aminoácido prolina, sendo encontrada tanto em eucarionte como em procariontes (HUANG *et al.*, 2006). A enzima PPIase tem sido reconhecida como uma chaperona molecular, auxiliando no dobramento e estabilização de proteínas ou no reenovelamento das mesmas em condições de estresse. Um aumento na expressão dessa enzima (2,5 vezes) foi observado sob condições de salinidade no cultivar tolerante (Pitiúba), retornando a nível comparáveis ao do controle após a recuperação do estresse (Figura 3). Isto sugere seu possível envolvimento na proteção conformacional de proteínas contra os efeitos deletérios do sal neste cultivar. Um aumento no número de transcritos do gene que codifica a enzima PPIase foi revelado por *microarray* em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) submetidas ao estresse salino (ZHOU *et al.*, 2007).

3.6- Proteínas com expressão diferenciada no cultivar TVu

A enzima ribulose 5-fosfato quinase (EC 2. 7. 1. 19) foi identificada no “spot” 60 dos géis do cultivar TVu (Figura 5) e, como observado no Pitiúba, sua expressão nas folhas

A)

```

VuESTsCont      ----MAAAFASSTTTFRPSNLADIKGLHLPNPNPNILKLRTRRSFGFGGCHGVTLVSKER- 55
GmXM_003556535  MTVTMAAAFTSTSATLRLSNVGESRGLQLRKCNPNPNKLVKMG-GFGGCSGVAVGVREERK 59
MtAFK36387      --MAAAAAFNVTTPPLFS-LSNVVAL-----NPNRRRSISVGVVRSRGGGVKLAVAVRR 52
                ****  :...  *  :..  .*  ***  :  .  **  :.*  *

VuESTsCont      GVDRG-LRVRASSSSVEDASVQAKVTQKVFFDISIGNPVGKLVGRVVIIGLYGDDVPQTAE 114
GmXM_003556535  GIGRVRVRVRASSSSDEAVSAQSKVTQKVFFDVSIGNPVGKLVGRIVIIGLYGDDVPQTAE 119
MtAFK36387      QVKVR--AVESGSSSEEKVIVQSKVTHKVFFDVSIGNPVGKLVGRIVIIGLFGDDVPQTVE 110
                :  *..** *  .  .*:***:*****:*****:*****:*****.*

VuESTsCont      NFRALCTGEKGFYKGSSTFHRVIKDFMIQGGDFDKNGTGGKSIYGRTFKDFENFI LSHTG 174
GmXM_003556535  NFRALCTGEKGFYKGSSTFHRVIKDFMIQGGDFDKNGTGGKSIYGRTFKDFENFNLSHTG 179
MtAFK36387      NFRALSTGEKGFYKGSSTFHRVIKDFMIQGGDFDKNGTGGKSIYGRTFKDFENFNLSHTG 170
                ***** .***** .*****

VuESTsCont      PGVVSMANAGPNTNGSQFFICTVKTPLWDQRHVVFQVLEGM DIVRLIESQETDRGDRPI 234
GmXM_003556535  PGVVSMANAGPNTNGSQFFICTVKTPLWDQRHVVFQVLEGM DIVRLIESQETDRGDRPT 239
MtAFK36387      PGAVSMANAGPNTNGSQFFICTVKTPLWDQRHVVFQVLEGM DIVRLIESQETDRGDRPL 230
                ** .*****

VuESTsCont      KKVTISDCGELPIA 248
GmXM_003556535  KKVTISDCGELPNA 253
MtAFK36387      KKVTISDCGELPIA 244
                ***** *

```

B)

Sequência A	Nome	Comprimento	Sequência B	Nome	Comprimento	Score
1	MtAFK36387	244	2	VuESTsCont	248	70,0
1	MtAFK36387	244	3	GmXM_003556535	253	74,0
2	VuESTsCont	248	3	GmXM_003556535	253	82,0

Figura 7. (A) Alinhamento de sequências de aminoácidos da proteína peptidil prolil cis-trans isomerase (PPIase) feita com o ClustalW2. A sequência deduzida de *Vigna unguiculata* (VuESTsCont) é comparada com aquelas de *Glycine max* (acesso: XM_003556535) e de *Medicago truncatula* (acesso: gb|AFK36387.1). As regiões conservadas estão realçadas em cinza. (B) Resumo do alinhamento mostrando os valores de identidade entre as sequências analisadas.

aumentou (2,1 vezes) durante o estresse salino e foi reduzida após o período de recuperação (Figura 6). Outra proteína que foi regulada de modo semelhante em ambos os cultivares pelo estresse salino, foi a sintase do ATP (EC 3. 6. 3. 14). No cultivar TVu, a subunidade β dessa enzima foi identificada no “spot” 172, mostrando um aumento na sua expressão de aproximadamente 3 vezes em relação ao controle (Figura 6). Estes resultados mostram que a regulação dessas proteínas é uma resposta comum no feijão de corda, e sugerem a participação delas na aclimatação da espécie às condições de salinidade.

A expressão da proteína 1 do complexo de evolução do O_2 (CEO1), identificada no “spot” 139, foi reduzida em torno de duas vezes no cultivar TVu durante o estresse salino (Figura 6). Este complexo consiste de três subunidades protéicas (CEO1, CEO2 e CEO3), codificadas no núcleo e que estão associadas periféricamente ao fotossistema 2 no lúmen dos tilacóides (SUGIHARA *et al.*, 2000). Portanto, uma redução na expressão da CEO1 pode indicar maior vulnerabilidade e maior dissociação do complexo a partir do PS2 no cultivar TVu, o que pode resultar em inibição da fotossíntese. Inesperadamente, na halófito *Thellungiella halophila*, Pang *et al.* (2010) encontraram redução na expressão da CEO1 durante o estresse salino. Os autores não conseguiram explicar o significado fisiológico dessa mudança. Em contraste, plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) submetidas ao estresse salino aumentaram a expressão da proteína 1 do CEO (KANG *et al.*, 2012).

Duas proteínas envolvidas com a estabilidade e montagem do fotossistema 2 foram identificadas nos géis do cultivar TVu (Figuras 5 e 6) e mostraram expressões diferenciadas em condições de estresse: o fator HCF136 de estabilidade e montagem do fotossistema 2 (“spot” 80) e a proteína estabilizante - II contendo Mn (“spot” 199). Neste estudo, a primeira foi induzida pela salinidade enquanto a segunda foi reprimida (Figura 6). Kang *et al.*, 2012 observaram um aumento na expressão do fator HCF136 de estabilidade do PS2 em plantas de trigo sob estresse salino.

A enzima anidrase carbônica (EC 4. 2. 1. 1) foi identificada no “spot” 163 dos géis bidimensionais do cultivar TVu (Figura 5). A sequência dessa proteína em *Phaseolus vulgaris*, obtida no MASCOT, foi utilizada em um BLAST contra o banco de EST's para *V. unguiculata*, o que permitiu a anotação do gene e a posterior tradução da proteína de *Vigna*. Análises feitas nos programas TargetP e ChloroP, mostraram que essa proteína tem uma sequência de endereçamento para o cloroplasto que, após processamento, gera uma proteína madura de pI e massa molecular teóricos de 6,10 e 32,61 kDa, respectivamente. A anidrase carbônica é uma metaloproteína que contém zinco e que catalisa a interconversão de CO₂ e HCO₃⁻ (CO₂ + H₂O ↔ HCO₃⁻ + H⁺). Nas plantas existem quatro tipos de anidrase carbônica (α, β, γ e δ), as quais estão envolvidas em uma variedade de processos biológicos, incluindo a regulação do pH, processos de transferência de CO₂, de troca iônica e de biossíntese, bem como a respiração e a fixação fotossintética de CO₂ (YU *et al.*, 2007). No presente estudo, a salinidade reduziu a expressão da anidrase carbônica nas folhas do cultivar TVu em torno de 2,5 vezes, a qual foi restabelecida no período pós-estresse.

Em plantas C₄, a maior atividade da anidrase carbônica é verificada no citosol das células do mesofilo, catalisando a hidratação do CO₂ a HCO₃⁻, que é o substrato da PEP carboxilase (HATCH; BURNELL, 1990). Nas plantas C₃, a atividade dessa enzima, principalmente no estroma dos cloroplastos das células do mesofilo, facilita a difusão do CO₂ através do cloroplasto (PRICE *et al.*, 1994). Portanto, em condições limitantes de CO₂ como aquelas impostas por vários tipos de estresses ambientais, a anidrase carbônica pode prevenir a fotorrespiração nas plantas, uma vez que nestas condições o equilíbrio da reação catalisada pela enzima é deslocado em favor da formação do CO₂. Estudos têm mostrado que a expressão da anidrase carbônica pode ser regulada por diversos fatores ambientais como luz, concentração de CO₂ e salinidade (KARLSSON *et al.*, 1998; MOSKVIN *et al.*, 2000). A expressão do gene que codifica a anidrase carbônica foi induzida tanto em tecidos de folhas

como de raízes de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas à salinidade, e também ao estresse osmótico induzido por PEG (YU *et al.*, 2007). Em contraste, o estresse salino reduziu as expressões da anidrase carbônica tanto no cultivar tolerante (Kennebec) quanto no sensível (Concord) de plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.), que somada às reduções em outras proteínas fotossintéticas, como a Rubisco, indicou uma vulnerabilidade do processo fotossintético dessas plantas em condições de salinidade (AGHAEI; EHSANPOUR; KOMATSU, 2008).

A subunidade maior da enzima ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (EC 4. 1. 1. 39), também conhecida como Rubisco, foi identificada no “spot” 195 dos géis do cultivar TVu (Figura 5). Esta enzima atua no primeiro passo da fixação do carbono no ciclo de Calvin, catalisando a reação de uma molécula de ribulose-1,5-bisfosfato com uma molécula de CO₂ para formar duas de 3-fosfoglicerato. O nível de expressão da Rubisco nas folhas do cultivar TVu foi reduzido (4,3 vezes) pela salinidade e, embora tenha aumentado após o período de recuperação do estresse, permaneceu menor do que o das plantas controle (Figura 6). No cultivar Pitiúba, a mesma proteína foi identificada no “spot” 207, no entanto, sua expressão foi mantida em condições de salinidade e sofreu um aumento de 2,2 vezes após a recuperação (Figura 3). Várias proteínas associadas com a fotossíntese têm mostrado mudanças de expressão em condições de estresse. Em plantas de algodão (*Gossypium herbaceum* L.) sob estresse hídrico, a redução na expressão da Rubisco foi relacionada com a inibição da fotossíntese, enquanto efeito contrário do estresse foi observado na expressão da subunidade alfa da enzima sintase do ATP, a qual foi aumentada (DEEBA *et al.*, 2012). De modo semelhante, Ali e Komatsu (2006) também encontraram reduções na expressão da Rubisco em arroz (*O. sativa* L.) sob estresse hídrico. Razavizadeh *et al.* (2009) verificaram um aumento na expressão da subunidade menor da Rubisco em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) após dois dias de exposição à salinidade (NaCl a 150 mM). No mesmo estudo, a

subunidade maior da Rubisco manteve sua expressão com dois dias de estresse, mas foi reduzida após quatro dias de exposição ao NaCl. Em outro estudo, os níveis de expressão das duas subunidades da Rubisco foram aumentados na parte aérea de plantas de milho (*Zea mays*) submetidas a baixas e altas concentrações de NaCl (25 e 100 mM) (ZÖRB *et al.*, 2004). Portanto, como para outras enzimas metabólicas, a Rubisco está sujeita tanto ao aumento como a diminuição da expressão em condições de estresse.

No cultivar TVu foi identificada a calreticulina (“spot” 262), a qual foi induzida pela salinidade em torno de 1,6 vezes e, após a recuperação do estresse, teve sua expressão aumentada 2 vezes em relação ao controle (Figura 5). A calreticulina é uma importante proteína ligadora de Ca^{2+} com função de chaperona molecular, desempenhando papéis fundamentais na homeostase do cálcio e no envelhecimento de proteínas no retículo endoplasmático de plantas (WANG *et al.*, 2004). A expressão da calreticulina foi reduzida em plantas de arroz (*O. sativa* L.) sob estresse osmótico (ZANG; KOMATSU, 2007). Estudos proteômicos com diferentes espécies vegetais em condições de salinidade mostraram aumentos e diminuições na expressão da calreticulina (AGHAEI; EHSANPOUR; KOMATSU, 2008; NAM *et al.*, 2012). Embora o papel da calreticulina na aclimação das plantas ao estresse seja ainda pouco conhecido, é provável que ela influencie as respostas das plantas regulando as concentrações citosólicas de cálcio livre, o qual é reconhecidamente um mensageiro secundário envolvido em vias de transdução de sinal que são iniciadas em resposta a vários tipos de estresse (LI *et al.*, 2008; SOBHANIAN *et al.*, 2010). Shaterian *et al.* (2005) acreditam que a calreticulina está envolvida na tolerância de clones de batata (*S. tuberosum*) à salinidade, sendo esta regulada pelo ácido abscísico (ABA) proveniente das raízes.

4. CONCLUSÕES

No presente estudo, ficou demonstrado que o grau moderado de salinidade imposto por 75 mM de NaCl causou mudanças no padrão de expressão de proteínas. Em adição, foi possível observar que, durante a recuperação das plantas do estresse salino, os mecanismos de homeostase às novas condições restabeleceram os níveis de algumas proteínas, o que sugere a participação delas no processo de aclimatação das plantas de feijão de corda ao estresse salino.

Os resultados da análise proteômica sugerem que a tolerância diferencial dos cultivares de feijão de corda pode estar relacionada, pelo menos em parte, com a regulação dos níveis de proteínas envolvidas nos passos iniciais da fotossíntese. Isto foi evidenciado pelos aumentos de expressão da ativase da Rubisco, fosforibuloquinase e proteína CEO2, bem como pela manutenção dos níveis da Rubisco no cultivar Pitiúba. Por sua vez, as reduções na expressão das proteínas CEO1, proteína estabilizante - II com Mn, anidrase carbônica e Rubisco no TVu, podem contribuir para a menor tolerância à salinidade desse cultivar.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAEI, K.; EHSANPOUR, A. A.; KOMATSU S. Proteome analysis of potato under salt stress. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 4858-4868, 2008.

AGHAEI, K.; EHSANPOUR, A. A.; SHAH, A. H.; KOMATSU, S. Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. **Amino Acids**, v. 36, p. 91-98, 2009.

ALI, G. M.; KOMATSU, S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 396-403, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 246-254, 1976.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK. Responses to abiotic stress. In: Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. (eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Mariland: American Society of Plant Physiologist, 2000, p. 1158-1203.

CARUSO, G.; CAVALIERE, C.; GUARINO, C.; GUBBIOTTI, R.; FOGLIA, P.; LAGANÀ, A. Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 381-390, 2008.

CATSKY, J. Determiration of water deficits in disc cut out from leaf blades. **Biologia Plantarum**, v. 2, p. 929- 938, 1960.

CHARTZOULAKIS, K.; KLAPAKI, G. Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. **Scientia Horticulturae**, v. 86, p. 247-260, 2000.

CHOUREY, K.; RAMANI, S.; APTE, S. K. Accumulation of LEA proteins in salt (NaCl) stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) cultivar Bura Rata and their degradation during recovery from salinity stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 1165-1174, 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 Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 289-297, 2003.

DEEBA, F.; PANDEY, A. K.; RANJAN, S.; MISHRA, A.; SINGH, R.; SHARMA, Y. K.; SHIRKE, P. A.; PANDEY, V. Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 53, p. 6-18, 2012.

DU, C. -X.; FAN, H. -F.; GUO, S. -R.; TEZUKA, T.; LI, J. Proteomic analysis of cucumber seedling roots subjected to salt stress. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1450-1459, 2010.

ECHEVARRÍA-ZOMEÑO, S.; ARIZA, D.; JORGE, I.; LENZ C.; DEL CAMPO, A.; JORRÍN, J. V.; NAVARRO, R. M. Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 233-245, 2009.

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

GAZANCHIAN, A.; HAJHEIDARI, M.; SIMA, N. K.; SALEKDEH, G. H. Proteome response of *Elymus elongatum* to severe water stress and recovery. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 291-300, 2007.

GHOULAM, C.; FOURSRY, A.; FARES, K. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 39-50, 2002.

GOMES, V. M.; MOSQUEDA, M. I.; BLANCO-LABRA, A.; SALES, M. P.; FERNANDES, K. V. S.; CORDEIRO, R. A.; XAVIER-FILHO, J. Vicilin storage proteins from *Vigna unguiculata* (Legume) seeds inhibit fungal growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4110-4115, 1997.

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

GUO, G.; GE, P.; MA, C.; LI, X.; LV, D.; WANG, S.; MA, W.; YAN, Y. Comparative proteomic analysis of salt response proteins in seedling roots of two wheat varieties. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 1867-1885, 2012.

HAJLAOUI, H.; AYEB, N. E.; GARREC, J. P.; DENDEN, M. Differential effects of salt stress on osmotic adjustment and solutes allocation on the basis of root and leaf tissue senescence of two silage maize (*Zea mays* L.) varieties. **Industrial Crops and Products**, v. 31, p. 122-130, 2010.

HATCH, M. D.; BURNELL, J. N. Carbonic anhydrase activity in leaves and its role in the first step of C₄ photosynthesis. **Plant Physiology**, v. 93, p. 825-828, 1990.

HUANG, F.; FULDA, S.; HAGEMANN, M.; NORLING, B. Proteomic screening of salt-stress-induced changes in plasma membranes of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. **Proteomics**, v. 6, p. 910-920, 2006.

INGLE, R. A.; SCHMIDT, U. G.; FARRANT, J. M.; THOMSON, J. A.; MUNDREE, S. G. Proteomic analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. **Plant Cell & Environment**, v. 30, p. 435-446, 2007.

JELLOULI, N.; JOUIRA, H. B.; SKOURI, H.; GHORBEL, A.; GOURGOURI, A.; MLIKI, A. Proteomic analysis of Tunisian grapevine cultivar Razegui under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 471-481, 2008.

KANG, G.; LI, G.; ZHENG, B.; HAN, Q.; WANG, C.; ZHU, Y.; GUO, T. Proteomic analysis on salicylic acid-induced salt tolerance in common wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, p. 1324-1333, 2012.

KAO, W. -Y, TSAI, T. -T.; TSAI, H. -C.; SHIH, C. -N. Response of three *Glycine* species to salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 120-125, 2006.

KARLSSON, J.; CLARKE, A. K.; CHEN, Z. Y.; HUGGHINS, S. Y.; PARK, Y. I.; HUSIC, H. D.; MORONEY, J. V.; SAMUELSSON, G. A novel α -type carbonic anhydrase associated with the thylakoid membrane in *Chlamydomonas reinhardtii* is required for growth at ambient CO₂. **The EMBO Journal**, v. 17, p. 1208-1216, 1998.

KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I. T.; RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1301-1322, 2011.

LACERDA, C. F.; COSTA, R. N. T.; BEZERRA, M. A.; GHEYI, H. R. Estratégias de manejo para uso de água salina na agricultura. In: Gheyi, H. R.; Dias, N. S.; Lacerda, C. F. (eds.). **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCT Sal, 2010, p. 303-315.

LI, Z.; CAO, Y.; ZHANG, J.; CHEN, S. Characterization of *Arabidopsis* calreticulin mutants in response to calcium and salinity stresses. **Progress in Natural Science**, v. 18, p. 1219-1224, 2008.

LI, W.; ZHANG, C.; LU, Q.; WEN, X.; LU, C. The combined effect of salt stress and heat shock on proteome profiling in *Suaeda salsa*. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 1743-1752, 2011.

LIU, Y.; DU, H.; HE, X.; HUANG, B.; WANG, Z. Identification of differentially expressed salt-responsive proteins in roots of two perennial grass species contrasting in salinity tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 117-126, 2012.

MA, H.; SONG, L.; SHU, Y.; WANG, S.; NIU, J.; WANG, Z.; YU, T.; GU, W.; MA, H. Comparative proteomic analysis of seedling leaves of different salt tolerant soybean genotypes. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 1529-1546, 2012.

MAJOUL, T.; CHAHED, K.; ZAMITI, E.; OUELHAZI, L.; GHRIR, R. Analysis by two-dimensional electrophoresis of the effect of salt stress on the polypeptide patterns in roots of a salt-tolerant and a salt-sensitive cultivar of wheat. **Electrophoresis**, v. 21, p. 2562-2565, 2000.

MOSKVIN, O. V.; IVANOV, B. N.; IGNATOVA, L. K.; KOLLMEIER, M. A. Light-induced stimulation of carbonic anhydrase activity in pea thylakoids. **FEBS Letters**, v. 470, p. 375-377, 2000.

MUHLING, K. H.; LAUCHLI, A. Effects of salt stress on growth and cation compartmentation in leaves of two plant species differing in salt tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 137-146, 2002.

MUNNS, R.; TERMAAT, A. Whole-plant responses to salinity. **Australian Journal Plant Physiology**, v.13, p. 143-160, 1986.

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

MURILLO-AMADOR, B.; TROYO-DIEGUEZ, E.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, J. L.; LÓPEZ-AGUILAR, R.; ÁVILA-SERRANO, N. Y.; ZAMORA-SALGADO, S.; RUEDA-PUENTE, E. O.; KAYA, C. Effect of NaCl salinity in the genotypic variation of cowpea (*Vigna unguiculata*) during early vegetative growth. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, p. 423-431, 2006.

NAM, M. H.; HUH, S. M.; KIM, K. M.; PARK, W. J.; SEO, J. B.; CHO, K.; KIM, D. Y.; KIM, B. G.; YOON, I. S. Comparative proteomic analysis of early salt stress-responsive proteins in roots of SnRK2 transgenic rice. **Proteome Science**, v. 10, p. 25, 2012.

NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262, 1988.

PANG, Q.; CHEN, S.; DAI, S.; CHEN, Y.; WANG, Y.; YAN, X. Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 2584-2599, 2010.

PÉREZ-LÓPEZ, U.; ROBREDO, A.; LACUESTA, M.; MENA-PETITE, A.; MUNÓZ-RUEDA, A. The impact of salt stress on the water status of barley plants is partially mitigated by elevated CO₂. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, p. 463-470, 2009.

PRAXEDES, S. C.; LACERDA, C. F.; DAMATTA, F. M.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Salt tolerance is associated with differences in ion accumulation, biomass allocation and photosynthesis in cowpea cultivars. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 196, p. 193-204, 2010.

PRICE, G. D.; VON CAEMMERER, S.; EVANS, J. R.; YU, J. W.; LLOYD, J.; OJA, V.; KELL, P.; HARRISON, K.; GALLAGHER, A.; BADGER, M. R. Specific reduction of chloroplast carbonic anhydrase activity by antisense RNA in transgenic tobacco plants has a minor effect on photosynthesis CO₂ assimilation. **Planta**, v. 193, p. 331-340, 1994.

RABILLOUD, T.; ADESSI, C.; GIRAUDEL, A.; LUNARDI, J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 18, p. 307-316, 1997.

RAZAVIZADEH, R.; EHSANPOUR, A. A.; AHSAN, N.; KOMATSU, S. Proteome analysis of tobacco leaves under salt stress. **Peptides**, v. 30, p. 1651-1659, 2009.

SALES, M. P.; GOMES, V. M.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J. Chitin binding proteins from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 29, p. 319-326, 1996.

SÁNCHEZ-BLANCO, M. J.; MORALES, M. A.; TORRECILLAS, A.; ALARCÓN, J. J. Diurnal and seasonal osmotic potential changes in *Lotus creticus creticus* plants grown under saline stress. **Plant Science**, v. 136, p. 1-10, 1998.

SHATERIAN, J.; GEORGES, F.; HUSSAIN, A.; WATERER, D.; DE JONG, H.; TANINO, K. K. Root to shoot communication and abscisic acid in calreticulin (CR) gene expression and salt-stress tolerance in grafted diploid potato clones. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, p. 323-332, 2005.

SHEN, S.; MATSUBAE, M.; TAKAO, T.; TANAKA, N.; KOMATSU, S. A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. **Journal of Biochemistry**, v. 132, p. 613-620, 2002.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1(6), p. 2856-2860, 2006.

SILVA, J. V.; LACERDA, C. F.; COSTA, P. H. A.; ENÉAS FILHO, J.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T. Physiological responses of NaCl stressed cowpea plants grown in nutrient solution supplemented with CaCl₂. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, p. 99-105, 2003.

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

SOBHANIAN, H.; RAZAVIZADEH, R.; NANJO, Y.; EHSANPOUR, A. A.; JAZIL, F. R.; MOTAMED, N.; KOMATSU, S. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. **Proteome Science**, v. 8, p. 20, 2010.

SOBHANIAN, H.; AGHAEI, K.; KOMATSU, S. Changes in the plant proteome resulting from salt stress: Toward the creation of salt-tolerant crops? **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1323-1337, 2011.

SUGIHARA, K.; HANAGATA, N.; DUBINSKY, Z.; BABA, S.; KARUBE, I. Molecular characterization of cDNA encoding oxygen evolving enhancer protein 1 increased by salt treatment in the mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. **Plant Cell Physiology**, v. 41, p. 1279-1285, 2000.

SWAMI, A. K.; ALAM, S. I.; SENGUPTA, N.; SARIN, R. Differential proteomic analysis of salt stress response in *Sorghum bicolor* leaves. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 321-328, 2011.

TEIXEIRA, S. M.; MAY, P. H.; SANTANA, A. C. Produção e importância econômica do caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-CNPAP, 1988. p. 101-136.

VINCENT, D.; ERGÜL, A.; BOHLMAN, M. C.; TATTERSALL, E. A. R.; TILLET, R. L.; WHEATLEY, M. D.; WOOLSEY, R.; QUILICI, D. R.; JOETS, J.; SCHLAUCH, K.; SCHOOLEY, D. A.; CUSHMAN, J. C.; CRAMER, G. R. Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 1873-1892, 2007.

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

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 244-252, 2004.

XU, C.; HUANG, B. Differential proteomic responses to water stress induced by PEG in two creeping bentgrass cultivars differing in stress tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 1477-1485, 2010.

YANG, Y.; WANG, L.; TIAN, J.; LI, J.; SUN, J.; HE, L.; GUO, S.; TEZUKA, T. Proteomic study participating the enhancement of growth and salt tolerance of bottle gourd rootstock-grafted watermelon seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 58, p. 54-65, 2012.

YU, S.; ZHANG, X.; GUAN, Q.; TAKANO, T.; LIU, S. Expression of a carbonic anhydrase gene is induced by environmental stresses in Rice (*Oryza sativa* L.). **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 89-94, 2007.

ZANG, X.; KOMATSU, S. A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. **Phytochemistry**, v. 68, p. 426-437, 2007.

ZHOU, S.; WEI, S.; BOONE, B.; LEVY, S. Microarray analysis of genes affected by salt stress in tomato. **African Journal of Environmental Science and Technology**, v. 1, p. 14-26, 2007.

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

ZÖRB, C.; SCHMITT, S.; NEEB, A.; KARL, S.; LINDER, M.; SCHUBERT, S. The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. **Plant Science**, v. 167, p. 91-100, 2004.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A caracterização fisiológica e bioquímica da resposta ao estresse salino nos cultivares Pitiúba e TVu de feijão de corda, revelou a complexidade dos mecanismos de tolerância à salinidade. O cultivar TVu, mais sensível, apresentou as maiores reduções no crescimento e nos parâmetros de trocas gasosas, ao mesmo tempo, em que acumulou menos íons Na^+ e Cl^- nas folhas e mais solutos orgânicos nos tecidos sob níveis crescentes de NaCl.

A proteômica de plantas sob salinidade, utilizando técnicas de eletroforese bidimensional (2D), é uma poderosa ferramenta para o estudo da expressão gênica em resposta ao estresse. A análise global dos padrões eletroforéticos 2D mostrou que os níveis crescentes de NaCl (50, 75 e 100 mM) reorganizaram de forma diferencial o padrão de expressão de proteínas nas folhas de ambos os cultivares.

As técnicas de extração de proteínas e eletroforese 2D mostraram-se compatíveis com a análise das proteínas presentes nos géis por espectrometria de massas. Considerando que os dados de sequência de proteínas, nucleotídeos e EST's para o feijão de corda (*V. unguiculata*) são limitados, o resultado de aproximadamente 80% (79% no Pitiúba e 82% no TVu) de identificações é notável.

As proteínas identificadas foram classificadas funcionalmente, sendo a maioria delas relacionadas com a fotossíntese (ativase da Rubisco, ribose-5-fosfato quinase, ribose-5-fosfato isomerase, proteínas CEO1 e CEO2 do complexo de evolução do oxigênio, fator HCF136 e proteína estabilizante - II do fotossistema 2, Rubisco e anidrase carbônica). Também foram identificadas uma chaperona (PPIase) e uma proteína relacionada à vias de transdução de sinal (calreticulina). As mudanças nos níveis de expressão dessas proteínas, tanto durante como após o período de estresse, sugerem participação delas no processo de aclimação à salinidade.

Este trabalho é pioneiro na caracterização das mudanças no proteoma de folhas de dois cultivares de feijão de corda com tolerância diferencial à salinidade. No geral, os resultados apresentados aqui fornecem informações adicionais que podem levar a uma melhor compreensão das bases moleculares da tolerância ou sensibilidade de plantas de feijão de corda à salinidade.