



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

**José Pedro Pires Torquato**

**ESTUDO DE MECANISMOS DE REGULAÇÃO DO SÓDIO**  
**CITOPLASMÁTICO EM CULTIVARES DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP.**  
**SUBMETIDAS À SALINIDADE**

**FORTALEZA - CE**

**2014**

**José Pedro Pires Torquato**

**ESTUDO DE MECANISMOS DE REGULAÇÃO DO SÓDIO  
CITOPLASMÁTICO EM CULTIVARES DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP.  
SUBMETIDAS À SALINIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. José Hélio Costa.

FORTALEZA

2014

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

---

- T64e Torquato, José Pedro Pires.  
Estudo de mecanismos de regulação do sódio citoplasmático em cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) WALP. submetidas à salinidade / José Pedro Pires Torquato. – 2014.  
139 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.  
Orientação: Prof. Dr. José Hélio Costa.
1. Bombas-de-prótons. 2. Expressão gênica. 3. Estresse salino. 4. NHX. 5. SOS1 e *Vigna unguiculata*. I. Título.

CDD 572

---

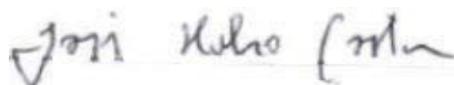
José Pedro Pires Torquato

**ESTUDO DE MECANISMOS DE REGULAÇÃO DO SÓDIO  
CITOPLASMÁTICO EM CULTIVARES DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP.  
SUBMETIDAS À SALINIDADE**

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

Aprovada em 28 de fevereiro de 2014.

Banca examinadora



---

Prof. Dr. José Hélio Costa.

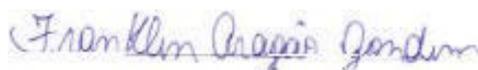
Universidade Federal do Ceará



---

Profa. Dra. Erika Freitas Mota

Universidade Federal do Ceará



---

Prof. Dr. Franklin Aragão Gondim

IFCE- Maracanaú



---

Profa. Dra. Maria Erivalda Farias de Aragão

Universidade Estadual do Ceará



---

Dra. Neuza Felix Gomes Rochette

Pesquisadora da FUNCAP, Universidade Federal do Ceará

A minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Esta tese só foi possível graças a ajuda de várias pessoas, dentre essas meus colegas do laboratório: Kátia, Henrique, Janaína, Antônio Edson, Georgia, Neusa, Beatriz, Edson, Michele, Joana, Flávio, Iará, Karine, Leonardo, Lourane, Dalton, Camila, Deborah e Carine.

A todos os meus colegas do laboratório de Bioenergética Vegetal.

Aos meus orientadores: José Hélio Costa e Dirce Fernandes de Melo, por toda a paciência e conselhos, sem eles nunca teria conseguido terminar.

A banca examinadora por suas valiosas contribuições.

A minha querida companheira Juliana.

A meus pais que sempre me deram apoio nos estudos.

E por último a meu filho Pedro Lucas, sem ele o mundo seria muito mais feio.

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

Os procedimentos experimentais que compõem esta tese foram realizados com o apoio dos seguintes Programas/Instituições:

**Universidade Federal do Ceará** - pelas atividades de capacitação no ensino e na pesquisa em Bioquímica. Bem como ao Laboratório de Bioenergética dos Sistemas Vegetais, onde os procedimentos experimentais foram realizados sob a coordenação da professora Dra. Dirce Fernandes de Melo e orientação do professor Dr. José Hélio Costa.

**Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI)/ Coodenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)** – por meio da concessão de bolsa de doutorado e de fomentos à pesquisa.

**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP)** - pela contribuição para a melhoria nas condições experimentais e formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

## RESUMO

No Nordeste brasileiro existem algumas áreas salinizadas e outras em processo de salinização, o que reduz drasticamente a produtividade das plantas. Muitos estudos tem sido feitos em relação ao efeito do estresse salino no crescimento e desenvolvimento das plantas. Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos de aclimação à salinidade nos diferentes órgãos vegetais, particularmente nos mecanismos de manutenção da homeostase iônica do sódio em *Vigna unguiculata*, envolvendo: enzimas, canais e transportadores. Para tal, foram utilizados dois cultivares com diferentes graus de suscetibilidade ao estresse salino: Pitiúba (tolerante) e Setentão (sensível). O objetivo do presente trabalho foi compreender as inter-relações entre as  $H^+$ -ATPases e o transportador SOS1, bem como, as inter-relações entre o transportador vacuolar NHX e as bombas de prótons vacuolares e seus papéis na regulação da concentração citoplasmática de  $Na^+$  em *Vigna unguiculata*, em resposta ao estresse salino. Para tal, foram avaliados parâmetros morfológicos: comprimento de raízes, caules e folhas, massa seca de raízes, caules e folhas, razão Raiz/Parte Aérea, e parâmetros bioquímicos: concentrações de prolina, malondialdeído, dos íons  $Na^+$  e  $K^+$  e a razão  $Na^+/K^+$ , em 5 diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl. Também foram analisados parâmetros moleculares nos dois cultivares Pitiúba e Setentão em plantas com 10 dias após a semeadura, submetidas ao NaCl (100 mM) por 120 horas. Genes codificadores da *SOS1*,  $H^+$ -ATPase tipo P e tipo V, pirofosfatases e *NHX* foram identificados através de buscas em bancos de dados de *V. unguiculata*. A expressão gênica foi avaliada em plantas com 10 dias após a semeadura, submetidas a NaCl 100 mM, nos tempos: 0, 6, 12, 24 e 48 horas após aplicação do estresse, através da técnica PCR em tempo real (qPCR). A avaliação conjunta dos dados possibilitou estabelecer as diferenças na forma de aclimação ao estresse salino entre os dois cultivares. Os parâmetros tais como: aspectos visuais, massa seca, área foliar e razão  $Na^+/K^+$  deram suporte para que Pitiúba seja classificada como um cultivar mais tolerante ao estresse salino em relação a Setentão. Os parâmetros, crescimento e percentual de água não foram conclusivos. O cultivar Pitiúba, apresentou uma concentração constitutiva de prolina maior do que Setentão nas folhas estando, portanto, melhor pré-aclimatado para tolerância ao estresse salino. A maior peroxidação lipídica nas folhas foi observada em Pitiúba. As buscas em bancos de dados revelaram que *V. unguiculata* apresenta pelo menos 1 gene *SOS1*, 13 genes  $H^+$ -ATPase tipo P, 7 genes *NHX*, 2 genes *PPase* e 1 gene *V-ATPase*

*subA*. Desses genes, *SOS1*, *H<sup>+</sup>-ATPase 06 e 48*, *NHX1*, *NHX2*, *PPase1* e *V-ATPase subA* foram induzidos em resposta ao estresse salino de maneira diferenciada em relação ao órgão e cultivar analisado. A partir desses dados foi possível inferir que a exclusão de Na<sup>+</sup> em Pitiúba ocorre principalmente nas raízes, enquanto que em Setentão ocorre mais intensamente nas folhas. A compartimentalização vacuolar do Na<sup>+</sup> é maior nas raízes de ambos os cultivares. Contudo, enquanto Pitiúba aumentou a expressão de *NHX1*, Setentão aumentou a expressão de *NHX2*. A indução de NHX foi acompanhada pelo aumento do mRNA da *PPase1* em ambos os cultivares e da *V-ATPase* em Pitiúba. Em folhas, o gene *SOS1* foi mais expresso em Setentão revelando uma co-expressão com dois genes da H<sup>+</sup>-ATPase (*H<sup>+</sup>-ATPase 06 e 48*), enquanto a expressão de *NHX1* aumentou apenas em Pitiúba. Em geral, os dados sugerem que os cultivares de *V. unguiculata* (Pitiúba e Setentão) utilizaram diferentes estratégias para minimizar os efeitos deletérios do estresse salino.

**Palavras-chave:** Bombas-de-prótons, expressão gênica, estresse salino, NHX, SOS1 e *Vigna unguiculata*.

## ABSTRACT

In the Northeast of Brazil, there are some salinized areas and others in the process of salinization, what drastically reduces plant productivity. Many studies have been done regarding the effect of saline stress on plant growth and development. However, there is little knowledge about the mechanisms of acclimatization to salinity in the different plant organs, particularly in the maintenance mechanisms of sodium ion homeostasis in *Vigna unguiculata*, involving: enzymes, channels and transporters. For this, two cultivars with different degrees of susceptibility to saline stress were used: Pitiúba (tolerant) and Setentão (sensitive). The objective of the present work was to understand the interrelationships between the  $H^+$ -ATPases and the SOS1 transporter, as well as the interrelationships between the vacuolar NHX transporter and the vacuolar proton pumps and their roles on regulating the  $Na^+$  cytoplasmic concentration in *Vigna unguiculata*, in response to saline stress. For this, morphological parameters were evaluated: roots, stems and leaves length, root, stems and leaves dry mass, ratio Root/Aerial, and biochemical parameters: proline, malondialdehyde,  $Na^+$  and  $K^+$  ions and the ratio  $Na^+/K^+$ , at 5 different concentrations (0, 25, 50, 75 and 100 mM) of NaCl. Molecular parameters in the two cultivars Pitiúba and Setentão were also analyzed in plants with 10 days after sowing, submitted to NaCl (100 mM) for 120 hours. *SOS1*, *H<sup>+</sup>-ATPase type P* and *type V*, *pyrophosphatases* and *NHX* encoding genes were identified through searches in *Vigna unguiculata* databases. The gene expression was evaluated in plants with 10 days after sowing, submitted to 100 mM NaCl, at the times: 0, 6, 12, 24 and 48 hours after stress application, using PCR technique in real-time (qPCR). The entirely evaluation of the data allowed to establish the differences in the form of acclimatization to the saline stress between the two cultivars. The parameters such as visual aspects, dry mass, leaf area and  $Na^+/K^+$  ratio gave support for Pitiúba to be classified as a salt tolerant cultivar in relation to the Setentão. The parameters, growth and percentage of water were not conclusive. The Pitiúba cultivar, presented a constitutive proline concentration in the leaves greater than the Setentão cultivar and being, therefore, better pre-acclimatized to tolerate saline stress. The highest lipid peroxidation in the leaves was observed in Pitiúba. The database searches revealed that *V. unguiculata* presents at least 1 *SOS1* gene, 13 *H<sup>+</sup>-ATPase type P* genes, 7 *NHX* genes, 2 *PPase* genes and 1 *V-ATPase subA* gene. Of these genes, *SOS1*, *H<sup>+</sup>-ATPase 06* and *48*, *NHX1*, *NHX2*, *PPase1* and *V-ATPase subA* were induced in response to saline stress in a differentiated

way in relation to organ and cultivar analyzed. From these data it was possible to infer that the exclusion of  $\text{Na}^+$  in Pitiúba occurs mainly in the roots, while in the Setentão it occurs more intensely in the leaves. Vacuolar compartmentalization of  $\text{Na}^+$  is higher in the roots of both cultivars. However, while Pitiúba increased expression of *NHX1*, Setentão increased expression of *NHX2*. *NHX* induction was accompanied by the mRNA increase of *PPase1* in both cultivars and V-ATPase in Pitiúba. In leaves, the *SOS1* gene was most expressed in the Setentão, revealing a co-expression with two  $\text{H}^+$ -ATPase genes (*H<sup>+</sup>-ATPase 06* and *48*), whereas *NHX1* expression increased only in Pitiúba. In general, the data suggest that the cultivars of *Vigna unguiculata* (Pitiúba and Setentão) used different strategies to minimize the deleterious effects of saline stress.

**Keywords:** Proton pumps, gene expression, saline stress, NHX, SOS1 and *Vigna unguiculata*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Caracterização do feijão de Corda. Em a) plantação do feijão Cowpea, em b) classificação botânica (VERDCOURT, 1970).....	11
Figura 2	Esquema ilustrativo dos principais mecanismos envolvidos na regulação da concentração de sódio citoplasmático, quando a célula vegetal é submetida ao estresse salino (elaboração do autor).....	18
Figura 3	A estrutura representa uma forma ativa da bomba de prótons, sem o C-terminal auto-inibidora, complexada com Mg-AMPPCP.....	24
Figura 4	Etapas da extração de RNA total.....	45
Figura 5	Plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , cultivares Setentão e Pitiúba, cultivadas em solução hidropônica, sob condições controle e 100 mM de NaCl (sal).....	50
Figura 6	Massa seca das raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias.	51
Figura 7	Comprimento das raízes (A), caules (B) e razão raiz/parte aérea (C) de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75, e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias.....	53
Figura 8	Percentual de água em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias.	55
Figura 9	Área foliar de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias.....	56
Figura 10	Concentrações de Na <sup>+</sup> solúvel (μmols g <sup>-1</sup> ms.) em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias.....	58
Figura 11	Concentrações de K <sup>+</sup> solúvel (μmols g <sup>-1</sup> ms.) em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias.....	59
Figura 12	Razão Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias.	61

Figura 13	Concentração de prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ms.}$ ) em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias.....	63
Figura 14	Concentração de Malondealdeído ( $\text{nmol g}^{-1} \text{mf.}$ ) em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias.....	64
Figura 15	RNA total extraído de raízes e folhas dos cultivares Pitiuba e Setentão nas condições controle e de estresse salino (100 mM de NaCl) visualizados em gel de agarose (1%)......	67
Figura 16	Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação do gene fator de alongação 1alfa 1(EF1 $\alpha$ 1) para avaliação da qualidade do cDNA produzido por PCR semi-quantitativa. Coramento realizado com Brometo de Etídio.....	68
Figura 17	Árvore filogenética dos genes <i>NHX</i> de (Pv) <i>Phaseollus vulgaris</i> e (Vu) <i>Vigna unguiculata</i> e (At) <i>Arabidopsis thaliana</i> . A árvore foi construída usando a ferramenta MEGA 5.05 empregando o algoritmo “Neighbour-joining”.....	69
Figura 18	Árvore filogenética dos genes <i>H<sup>+</sup>-atpase</i> (próton atpase de membrana plasmática) de (Pv) <i>Phaseulus vulgaris</i> e (Vu) <i>Vigna unguiculata</i> .....	70
Figura 19	Expressão relativa do gene <i>H<sup>+</sup>-ATPase 06</i> . O nível de expressão do gene <i>H<sup>+</sup>ATPase 06</i> , foi normalizado usando a expressão dos genes: <i>EF-F1<math>\beta</math></i> , <i>IDE</i> e <i>F-box</i> . A – Folhas; B – Raízes.....	72
Figura 20	Expressão relativa do gene <i>H<sup>+</sup>-ATPase 48</i> . O nível de expressão do gene <i>H<sup>+</sup>ATPase 48</i> , foi normalizado usando a expressão dos genes: <i>EF-F1<math>\beta</math></i> , <i>IDE</i> e <i>F-box</i> . A – Folhas; B – Raízes.....	73
Figura 21	Expressão relativa do gene <i>VuATPase subA</i> . O nível de expressão do gene <i>V-ATPase subA</i> , foi normalizado usando a expressão dos genes: <i>EF-F1<math>\beta</math></i> , <i>IDE</i> e <i>F-box</i> . A – Folhas; B – Raízes.....	74
Figura 22	Expressão relativa do gene <i>SOS1</i> . O nível de expressão do gene <i>SOS1</i> , foi normalizado usando a expressão dos genes: <i>EF-F1<math>\beta</math></i> , <i>IDE</i> e <i>F-box</i> . A – Folhas; B – Raízes.....	75
Figura 23	Expressão relativa do gene <i>Ppase1</i> . O nível de expressão do gene <i>Ppase1</i> , foi normalizado usando a expressão dos genes <i>EF-F1<math>\beta</math></i> , <i>IDE</i> e <i>F-box</i> . A – Folhas; B- Raízes.....	77
Figura 24	Expressão relativa do gene <i>NHX1</i> . O nível de expressão do gene <i>NHX1</i> , foi normalizado à expressão dos genes <i>EF-F1<math>\beta</math></i> , <i>IDE</i> e <i>F-box</i> . A – Folhas; B – Raízes.....	78

- Figura 25 Expressão relativa do gene *NHX2*. O nível de expressão do gene *NHX2*, foi normalizado à expressão dos genes *EF-F1 $\beta$* , *IDE* e *F-box*.  
A – Folhas; B – Raízes..... 79
- Figura 26 Esquema representativo de expressão dos genes de proteínas envolvidas na exclusão celular (*SOS1*;  $H^+$ -ATPase) ou compartimentalização vacuolar de  $Na^+$  (*NHX*, V-ATPase e PPase).... 96

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Relação dos genes das H <sup>+</sup> -ATPases de membrana de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
<b>Tabela 2</b>	<i>Primers</i> utilizados nas análises de expressão gênica de <i>Vigna unguiculata</i> (L) através de RT – qPCR. Dados da temperatura ótima de anelamento e tamanho dos <i>amplicons</i> também são mostrados.....	43
<b>Tabela 3</b>	Componentes e volumes usados nas reações de transcrição reversa....	48
<b>Tabela 4</b>	Valores médios das concentrações e razões de absorbâncias dos RNAs extraídos de raízes e folhas de <i>Vigna unguiculata</i> (cultivares Pitiúba e Setentão), plantas em condições controle e estresse salino....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**MDA:** Malondialdeído

**EF1 $\alpha$ :** Fator de alongação 1 alfa

**NHX:** Trocador de Sódio Próton

**H-ATPase:** Proton ATPase

**IDE:** Insulinase

**F-BOX:** Protéina da família F-Box

**EF1 $\beta$ :** Fator de alongação 1 beta

**VATPase:** ATPase vacuolar

**SOS:** Salt overly sensitive

**Ppase:** Pirofosfatase

**PCR:** Reação de Cadeia da polimerase

**qPCR:** Reação de Cadeia da polimerase em tempo real

**EST:** Etiquetas de sequências expressas

**mM:** Milimolar

**Na<sup>+</sup>:** Íon Sódio

**K<sup>+</sup>:** Íon Potássio

**NaCl:** Cloreto de Sódio

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1</b> <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>4</b>
<b>2</b> <b>OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1</b> Objetivo Geral.....	<b>8</b>
<b>2.2</b> Objetivos específicos.....	<b>8</b>
<b>3</b> <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1</b> O feijão de corda ( <i>Vigna unguiculata</i> (L)Walp).....	<b>9</b>
<b>3.1.1</b> Classificação botânica do <i>Vigna unguiculata</i> .....	<b>10</b>
<b>3.2</b> O estresse salino.....	<b>12</b>
<b>3.2.1</b> Os mecanismos de aclimação ao estresse salino.....	<b>15</b>
<b>3.2.2</b> A via SOS.....	<b>19</b>
<b>3.2.3</b> As H <sup>+</sup> -ATPases da Membrana plasmática.....	<b>21</b>
<b>3.2.4</b> As bombas de prótons vacuolares.....	<b>28</b>
<b>3.2.4.1</b> H <sup>+</sup> ATPases tipo V (vacuolares).....	<b>30</b>
<b>3.2.4.2</b> As pirofosfatases.....	<b>33</b>
<b>3.2.5</b> Os transportadores vacuolares NHX.....	<b>34</b>
<b>4</b> <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1</b> Obtenção e preparo das sementes de <i>Vigna unguiculata</i> .....	<b>37</b>
<b>4.2</b> Germinação das sementes de <i>Vigna unguiculata</i> .....	<b>37</b>
<b>4.3</b> Cultivo hidropônico de <i>Vigna unguiculata</i> e aplicação do NaCl.....	<b>37</b>
<b>4.4</b> Delineamento experimental.....	<b>38</b>
<b>4.5</b> Análise estatística.....	<b>38</b>
<b>4.6</b> Determinação de parâmetros fisiológicos e bioquímicos.....	<b>38</b>
<b>4.6.1</b> Determinação dos tamanhos dos diferentes órgãos.....	<b>38</b>
<b>4.6.2</b> Estabelecimento da razão raiz/parte aérea.....	<b>38</b>
<b>4.6.3</b> Determinação da área foliar.....	<b>39</b>
<b>4.6.4</b> Determinação do peso fresco e seco dos diferentes órgãos.....	<b>39</b>

4.6.5	Determinação do percentual de água dos diferentes órgãos.....	39
4.6.6	Determinação da concentração de Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup> solúveis nos diferentes órgãos.....	39
4.6.7	Determinação da concentração de prolina nos diferentes órgãos.....	40
4.6.8	Determinação da concentração de Malondialdeído nos diferentes órgãos.....	40
4.7	Estudos moleculares: Caracterização e expressão de genes de proteínas envolvidas na extrusão/compartimentalização de Na <sup>+</sup> .....	41
4.8	Levantamento <i>in silico</i> das informações sobre os genes de interesse em <i>Vigna unguiculata</i> .....	41
4.9	Alinhamento das sequências e análise filogenética.....	42
4.10	Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ).....	42
4.11	Extração do RNA total.....	44
4.12	Testes de quantificação, pureza e integridade do RNA total.....	46
4.13	Quantificação das amostras de RNA total e dos <i>primers</i> .....	47
4.14	Determinação da temperatura ótima de anelamento dos <i>primers</i> .....	48
4.15	Reações de transcrição reversa.....	48
4.16	Teste da qualidade do cDNA por PCR semi-quantitativa.....	48
4.17	Reações de qPCR.....	48
4.18	Análise dos dados de expressão por RT-qPCR.....	49
5	<b>RESULTADOS</b> .....	50
5.1	Estudos Fisiológicos e bioquímicos.....	50
5.1.1	Resposta visual dos cultivares Pitiúba e Setentão de <i>Vigna unguiculata</i> à aplicação de 100 mM de NaCl na solução hidropônica.....	50
5.1.2	Massa seca dos diferentes órgãos.....	50
5.1.3	Comprimento de raízes, caules e relação Raiz/Parte aérea de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> submetidas a diferentes concentrações de NaCl.....	52
5.1.4	Percentual de água em raízes, caules e folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> submetidas a diferentes concentrações de NaCl.....	54
5.1.5	Efeito de diferentes concentrações de NaCl no crescimento foliar em plantas de <i>Vigna unguiculata</i> .....	56

5.1.6	Concentrações de Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup> solúveis em raízes, caules e folhas de <i>Vigna unguiculata</i> .....	57
5.1.6.1	Razão Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> em raízes, caules e folhas de <i>Vigna unguiculata</i> .....	60
5.1.7	Concentração de prolina em raízes, caules e folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , submetidas a diferentes concentrações de NaCl...	62
5.1.8	Concentração de Malondialdéido em raízes, caules e folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , submetidas a diferentes concentrações de NaCl.....	62
5.2	Estudos Moleculares.....	65
5.2.1	Quantificação e integridades dos RNAs totais.....	65
5.2.2	Identificação dos genes de <i>Vigna unguiculata</i> envolvidos no transporte de Na <sup>+</sup> .....	68
5.2.2.1	Análise das relações filogenéticas entre os genes das famílias multigênicas NHX e H <sup>+</sup> ATPase de leguminosas .....	69
5.2.3	Análise da expressão gênica.....	71
5.2.3.1	Expressão relativa dos genes das H <sup>+</sup> ATPase tipo P de <i>Vigna unguiculata</i> .....	71
5.2.3.2	Expressão relativa do gene da H <sup>+</sup> ATPase tipo V subunidade A de <i>Vigna unguiculata</i> .....	74
5.2.3.3	Expressão relativa do gene da SOS1 de <i>Vigna unguiculata</i> .....	75
5.2.3.4	Expressão relativa dos genes das Ppase de <i>Vigna unguiculata</i> .....	76
5.2.3.5	Expressão relativa dos genes das NHX de <i>Vigna unguiculata</i> .....	77
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	80
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	98
8	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	99

## 1 INTRODUÇÃO

A centenas de anos a agricultura vem utilizando a aplicação de adubos, bem como, as técnicas de irrigação, ambas tem na maioria dos casos contribuído para uma melhoria da produtividade agrícola (PARIDA & DAS, 2005), no entanto, ambas: adubação e irrigação quando realizadas sem os devidos critérios metodológicos, levam a salinização dos solos (MARINHO *et al.*, 2006). Tem sido demonstrado que culturas quando cultivadas em solos salinos apresentam perda da produtividade (FLOWERS, 2004). A perda de produtividade agrícola ocasionadas por salinização dos solos tem sido associada a efeitos tóxicos, osmóticos e nutricionais (VIANA *et al.*, 2004, ASSIS JÚNIOR *et al.*, 2007). Com o aumento das áreas salinizadas, estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares são indispensáveis para tentar compreender os processos de adaptação vegetal ao estresse salino, visto que fornecem ferramentas para a produção de cultivares tolerantes a estas condições adversas. A porta de entrada dos íons sódio na planta é a raiz, que precisa estabelecer mecanismos de controle da absorção destes íons, a fim de manter concentração homeostática do  $\text{Na}^+$ . Tentando minimizar os efeitos deletérios das elevadas concentrações citoplasmáticas, a planta pode distribuir estes íons, mantendo-os compartimentalizados nos vacúolos. Quando ocorre um estresse, causado por maiores concentrações de sódio, a planta gastará mais energia na tentativa de reduzir a absorção deste íon pela raiz, visto que, caso este seja redistribuído pelos vários órgãos da planta, irá causar alterações metabólicas prejudiciais (CHRISPEELS *et al.*, 1999).

O acúmulo de sódio vacuolar é uma solução temporária devido ao tamanho limite que o vacúolo pode alcançar, sendo mais lógico translocar o sódio para o meio extracelular, de onde ele poderá ser translocado, levando a redução da concentração na rizosfera. Estudos têm mostrado que para evitar os efeitos nocivos de íons  $\text{Na}^+$  em células vegetais, o excesso destes é removido para o apoplasto ou compartimentalizado no tonoplasto (BLUMWALD, 2000, BLUMWALD *et al.*, 2000). O sequestro do  $\text{Na}^+$  para o interior do vacúolo é uma estratégia importante e econômica, porque não só reduz a toxicidade de sódio no citosol, mas também auxilia na manutenção da homeostase osmótica (ZHU, 2003). Para o entendimento das adaptações das plantas ao estresse salino é conveniente lembrar que, durante a absorção de sais, a membrana plasmática é a primeira barreira seletora dos íons que entram na célula. Portanto,

segundo Yu *et al.* (2011), desempenha um papel relevante na manutenção da regulação osmótica, a qual depende de vários mecanismos e componentes como a via SOS e as H<sup>+</sup>-ATPases tipo P. A via SOS (salt overly sensitivity) é ativada quando a planta é exposta a elevadas concentrações de sódio, levando à redução da concentração deste íon no citoplasma, os componentes desta via promovem o deslocamento deste íon para o meio extracelular (EKBERG *et al.*, 2010). As H<sup>+</sup>-ATPases tipo P são responsáveis pela formação do gradiente eletroquímico da membrana plasmática. Na membrana plasmática a SOS1 e as H<sup>+</sup>-ATPases devem estar correlacionadas e envolvidas no controle osmótico, em especial, na adaptação e aclimação ao estresse salino, visto que a proteína SOS1 é preferencialmente expressa em condições de estresse salino (TANG *et al.*, 2010). Sendo esta proteína um dos componentes fundamentais da via SOS, onde atua no transporte dos íons sódio do meio intracelular para o meio extracelular. O mecanismo de detecção do estresse salino por meio da via SOS se inicia pela ação da proteína SOS3 que é um sensor de cálcio. Esta proteína se complexa com uma proteína quinase denominada SOS2 formando o complexo SOS2-SOS3 que ativa a expressão da SOS1. A via SOS tem dois mecanismos distintos de regulação em *Arabidopsis thaliana* (CHOI *et al.*, 2011). Quando a planta é submetida a um estresse salino moderado a SOS1 atua no enchimento do xilema e transporte do excesso de sódio para o caule (transporte a longa distância) onde este íon é compartimentalizado no vacúolo em *Arabidopsis thaliana* (SÁNCHEZ-BARRENA *et al.*, 2005). Já no estresse severo, o mecanismo de ação é reduzir a entrada de Na<sup>+</sup> no xilema por meio da exsudação do sódio pela raiz (ZHU, 2001). Estes mecanismos distintos podem reduzir a entrada do íon ou aumentar a extrusão do mesmo. Para aumentar a extrusão se faz necessária a provável participação de dois componentes: a via SOS e as H<sup>+</sup>-ATPases tipo P, esta última atuando como geradora do gradiente força eletromotora.

A via SOS é responsável pela translocação para fora da membrana plasmática dos íons sódio, mas depende do gradiente eletroquímico na membrana plasmática por ser composta por um transportador do tipo antiporte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, onde o próton entra na célula ao mesmo tempo que o sódio é expelido. O gradiente eletroquímico externo da membrana plasmática é formado pela ação da H<sup>+</sup>-ATPase tipo P que deverá sofrer alterações na sua atividade, regulação e ou expressão quando houver uma necessidade maior da formação deste gradiente, indispensável à ação do sistema SOS (SHI *et al.*, 2000).

Por outro lado, visto que a taxa de influxo do  $\text{Na}^+$  costuma ser maior que a taxa de efluxo devido ao transporte vigoroso do sódio da solução do solo para o interior da planta, a resposta mais imediata que ocorre sempre que a concentração intracelular dos íons sódio aumenta é a sua compartimentalização no vacúolo. Tal fato se dá pela ação conjunta das NHX (transportador do tipo antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ), pirofosfatases e  $\text{H}^+$ -ATPase tipo V (CHEN *et al.*, 2012), sendo a NHX responsável pelo transporte de  $\text{Na}^+$  para dentro do tonoplasto. Para seu funcionamento, a NHX depende do estabelecimento do gradiente eletroquímico de  $\text{H}^+$  gerado em torno do vacúolo pelas bombas de prótons vacuolares: pirofosfatase (Ppase) e  $\text{H}^+$ -ATPase tipo V.

Sabe-se que as plantas apresentam diferentes mecanismos de aclimação ao estresse salino, os quais podem ser ativados em diversos órgãos e sob diferentes intensidades de estímulos (GUPTA & HUANG, 2014). Aquelas plantas que utilizarem melhor seus recursos energéticos para ativação desses mecanismos estarão mais aptas a resistir a esse estresse. Para a elucidação dessa afirmativa, no presente trabalho foram utilizados dois cultivares do feijão-de-corda, que é uma espécie muito utilizada comercialmente por desempenhar importantes papéis: nutricional, social e econômico na região nordeste, principalmente nas pequenas propriedades rurais (FREIRE FILHO, *et al.*, 1999). Estudos caracterizaram o cultivar Pitiúba como sendo um dos cultivares de *Vigna unguiculata* mais resistentes ao estresse salino (LOBATA *et al.*, 2009), já o cultivar setentão foi classificada como sendo sensível a esse estresse, de acordo com dados fornecidos pelo Laboratório de Sementes da Universidade Federal do Ceará (não publicados). Logo, esses dois cultivares parecem ser excelentes modelos experimentais para se estudar as respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares de *Vigna unguiculata* ao estresse salino. Portanto, a hipótese é de que devem existir inter-relações entre os processos de exsudação dos íons sódio (via SOS e  $\text{H}^+$ -ATPase tipo P) ou de compartimentalização (via NHX, Ppases e  $\text{H}^+$ -ATPase tipo V) sob condições de estresse salino e que estes processos devem ser diferentes entre os diferentes órgãos da planta e cultivares.

Dessa forma, no presente trabalho estudaram-se os efeitos do NaCl sobre os parâmetros de crescimento (massa seca, comprimento da planta, área foliar, percentual de água), bioquímicos (concentrações de sódio e potássio solúvel, prolina e malondialdeído) e moleculares (expressão relativa dos genes das proteínas envolvidas na exsudação e compartimentalização do  $\text{Na}^+$ ). A análise conjunta destes dados forneceu indícios dos processos envolvidos na tolerância ao estresse salino,

possibilitando, inclusive, a identificação de possíveis genes alvos, que poderão ser utilizados como ferramentas biotecnológica para a obtenção de cultivares tolerantes à salinidade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos na homeostase do sódio citoplasmático em dois cultivares de *Vigna unguiculata* submetidos a estresse salino: Pitiúba (tolerante) e Setentão (sensível).

### 2.2 Objetivos específicos

Identificar a concentração ótima de NaCl para a caracterização do grau de sensibilidade ao estresse em *Vigna unguiculata* cultivares Pitiúba e Setentão através do estudo de:

- 1- Parâmetros Fisiológicos: comprimento das plantas (raízes e caules); razão raiz/parte aérea; área foliar; peso fresco e seco das plantas (raízes, caules e folhas). E percentual de água nas plantas (raízes, caules e folhas);
- 2- Parâmetros Bioquímicos: concentração de sódio solúvel (raízes, caules e folhas); concentração de potássio solúvel (raízes, caules e folhas); razão  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (raízes, caules e folhas); concentração de Prolina (raízes, caules e folhas) e concentração de Malondialdeído (raízes, caules e folhas);
- 3- Parâmetros Moleculares: realizar levantamento *in silico* da quantidade de genes para:  $\text{H}^+$ -ATPases tipo P e V, NHX, PPases e SOS1 em *Vigna unguiculata*, usando como base o genoma de *Phaseolus vulgaris*; anotar os genes para:  $\text{H}^+$ -ATPases tipo P e V, NHX, PPases e SOS1 de *Vigna unguiculata*; desenhar *primers* específicos para os genes:  $\text{H}^+$ -ATPases tipo P e V, NHX, PPases e SOS1 de *Vigna unguiculata*; quantificar a expressão dos transcritos dos genes:  $\text{H}^+$ -ATPases tipo P e V, NHX, PPases e SOS1 por qPCR em raízes e folhas de *Vigna unguiculata* cultivares Pitiúba e Setentão nas condições controle e de estresse salino.

### 3 Fundamentação teórica

#### 3.1 O feijão de corda (*Vigna unguiculata* L. Walp)

O feijão de corda é cultivado em praticamente todo o território nacional, contudo, grande parte da produção está concentrada em apenas 10 estados, PR, MG, BA, SP, GO, SC, RS, CE, PE e PA, responsáveis por praticamente 85% da produção nacional. O Ceará apresentou na safra de 2012 uma produção de 307,8 mil toneladas de grãos, dentro de uma área plantada de 616,1 mil hectares e uma produtividade média de 499 kg/ha (CONAB, 2012). Contudo, este valor, para a produção, não é o ideal, sendo considerado baixo uma vez que, para o monocultivo com alta tecnologia, tem-se obtido, em experimentos, valores mais de 3000kg/ha (BERTINI *et al.*, 2010).

Apesar da cultura estar praticamente estagnada nestes últimos anos, onde a falta de chuvas tem reduzido drasticamente a produtividade, mesmo assim, em algumas localidades a produção tem crescido, devido a introdução de variedades mais produtivas e mais resistentes, e também pela inserção do maior número de produtores usando tecnologia (IPECE, 2014). Entretanto, destaca-se que grande parte da atividade esta nas mãos dos pequenos produtores, constituindo-se quase de uma atividade de subsistência para pequenas propriedades, principalmente na região nordeste, responsável por 30% da produção nacional. (EMBRAPA, 2012). O feijão de corda ocupa 9,5% da área destinada ao cultivo de feijão no Brasil, onde 70% da população consome feijão diariamente, sendo ao mesmo tempo o maior produtor e consumidor deste grão (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014).

Sob o ponto de vista nutricional o feijão de corda é o vegetal mais importante para a abtenção de proteínas (apesar de ser uma fonte de proteínas com deficiência em aminoácidos sulfurados) e a segunda melhor fonte de carboidratos usada pela população brasileira, suas sementes contém 23% de proteínas, 56% carboidratos e 4% de fibras (IQBAL *et al.*, 2006).

As características nutricionais da planta são semelhantes às encontradas por Cruz *et al.* (2005) em *Phaseolus vulgaris*, no entanto, o feijão de corda apresenta níveis mais elevados de ácido fólico, menores níveis de fatores antinutricionais e de fatores de flatulência (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014). O feijão *Vigna unguiculata* ou caupi é a principal fonte de proteínas de origem vegetal para consumo humano no Ceará. Devido então a importância dessa cultura para o estado, o Ceará é responsável por cerca de 20% da produção nacional (ROCHA, 2009), oriunda principalmente das

pequenas propriedades rurais sob a exploração familiar (ROCHA, 2009). O principal produto extraído desta cultura são os grãos secos, por seu alto valor protéico. Entretanto, além dos grãos secos destacam-se também os grãos frescos e as vagens verdes que são largamente consumidos. Após a colheita, as partes restantes da planta podem ser utilizadas em adubação verde (para o plantio direto) e como forragem. Em muitos casos, seu cultivo se dá em consórcio com outras culturas como sorgo (*Sorghum bicolor* (L.)), milho (*Zea mays* (L.)), mandioca (*Manihot esculenta*. Crantz) ou algodão (*Gossypium barbadense* (L.)) (BLADE *et al.*, 1997). Como é uma leguminosa, ela tem a capacidade de se associar a bactérias do solo que fixam nitrogênio do ar, permitindo que cresça em solos de baixa fertilidade natural (ELOWAD e HALL, 1987; KWAPATA & HALL, 1985; ARRUDA *et al.*, 2009).

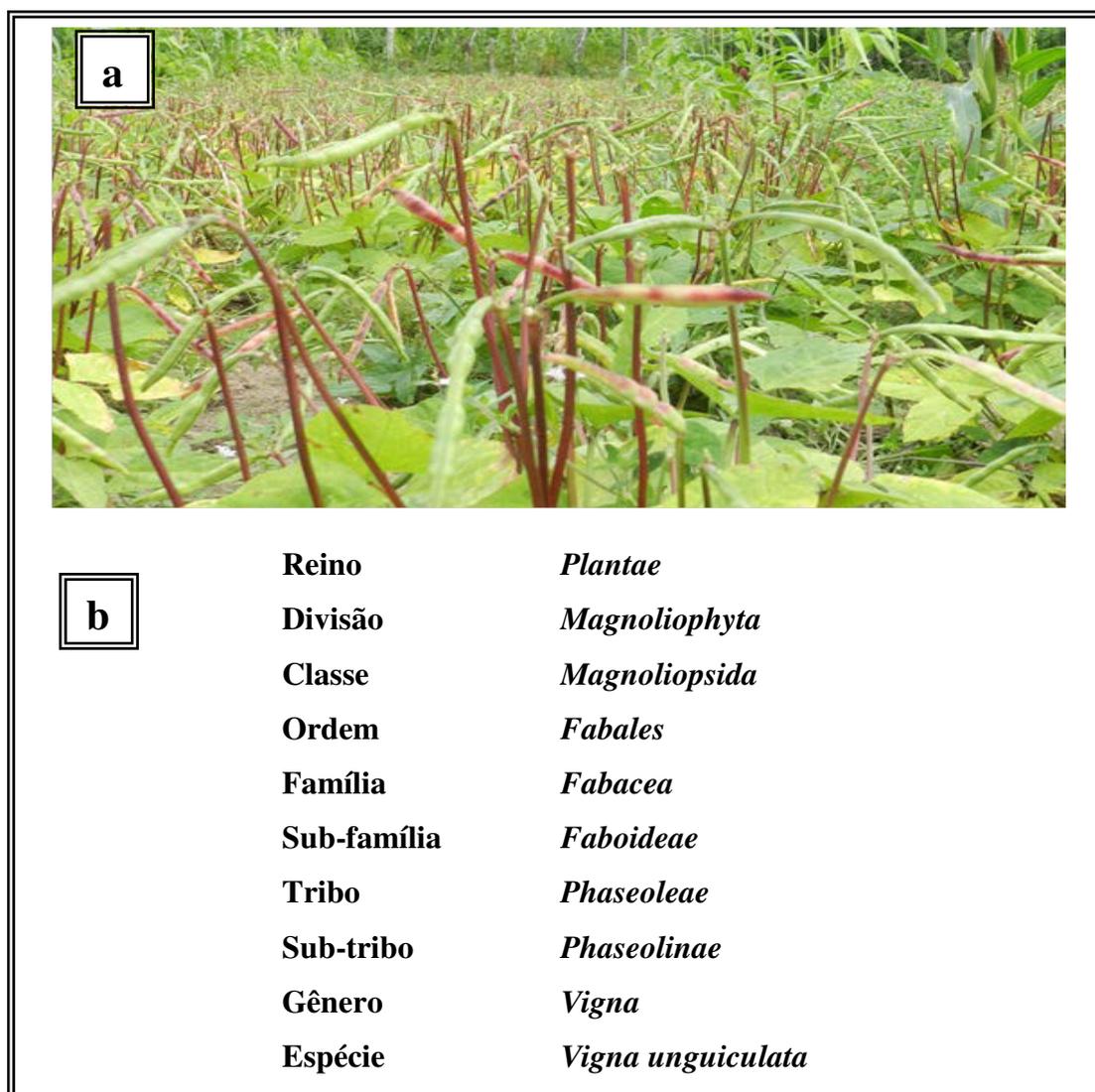
O feijão de corda tem se destacado por tratar-se de uma das mais amplamente adaptadas, versáteis e das mais nutritivas leguminosas para grão. No critério versatilidade, devemos destacar também a sua adaptação à seca. Tem sido utilizada em grandes áreas com temperaturas elevadas e disponibilidade de índices pluviométricos variados, como os encontrados na África (Sudão, Quênia, Tanzânia, Angola, Moçambique), América do Sul (norte e semi-árido nordestino), Ásia, América do Norte (EHLERS & HALL, 1997; DAVIS *et al.*, 1986). Quando comparada as outras culturas com elevado valor nutricional (CAVALCANTE, 2010), o *Vigna unguiculata* tolera relativamente bem a sua utilização em solos ácidos e alcalinos (HALL & PATEL, 1985; FERY, 2002).

No estado do Ceará esta cultura detém a maior parte das áreas de cultivo, sendo uma das principais culturas usadas nos consórcios em áreas irrigadas com culturas perenes, pois além do retorno financeiro, auxilia na fixação de nutriente ao solo, como exemplo, o consórcio coco x feijão, amplamente praticado no litoral do estado (AGEITEC, 2010). O *Vigna unguiculata* tem se mostrado uma espécie importante nas rotações de cultura devido à sua habilidade de suprimir as galhas de nematóides (*Meloidogyne spp*). Porém, a deficiência nutricional dos solos é considerada um dos principais fatores atribuídos ao baixo rendimento do cultivo do feijão-de-corda nos solos do litoral do estado (BELTRÃO JÚNIOR *et al.*, 2012).

### **3.1.1 Classificação botânica de *Vigna unguiculata***

A espécie *Vigna unguiculata*, (L.), popularmente conhecida como feijão de corda e feijão caupi (cowpea), trata-se de uma eudicotiledônea (FERY, 2002).

A figura 1A mostra uma plantação de feijão de corda e a figura 1B mostra a classificação botânica de *Vigna unguiculata*.



**Figura 1.** Caracterização do feijão de Corda. Em a) plantação do feijão Cowpea, em b) classificação botânica (VERDCOURT, 1970).

A família *Fabaceae* consiste de 757 gêneros e mais de 20.000 espécies (LEWIS *et al.*, 2005; TIMKO *et al.*, 2008). O gênero *Vigna* que já foi *Leguminosae*, é composto de mais de 200 espécies que são nativas de regiões quentes (FERY, 2002).

Nas ultimas décadas mais de 100 cultivares de cowpea foram desenvolvidas no Brasil (FERY, 2002), e dentre estes cultivares podemos destacar Pitiuba e Setentão. O cultivar setentão foi desenvolvida pela Universidade Federal do Ceará na década de 90. Caracteriza-se pela cor creme esverdeada do tegumento, a qual é bem aceito pelo consumidor desta leguminosa. Além disso, este cultivar apresenta boa produtividade, superando alguns cultivares atualmente cultivados no nordeste do Brasil.

É resistente ao "cowpea severe mosaic virus" (CpSMV, vírus do mosaico severo do cowpea) e altamente resistente a uma estirpe de "mosaic virus" (CMV, vírus do mosaico do pepino) (PAIVA *et al.*, 1990). Apesar de se tratar de um cultivar que é explorada comercialmente a mais de 20 anos a literatura científica sobre a mesma ainda é escassa (TORQUATO, 2009). Lobato *et al.*, (2009) afirmam que o cultivar Pitiuba suporta estresse salino moderado (75 mM NaCl), sem apresentar perdas na produtividade.

### **3.2 O estresse salino**

Estresse é definido como alterações de situações fisiológicas causadas por fatores que tendem a afetar o equilíbrio, causando uma tensão física e/ou química (GASPER *et al.*, 2002; CHAVES *et al.*, 2002; CHAVES *et al.*, 2003; HU *et al.*, 2006).

O termo estresse deve ser usado no caso de uma restrição ou quando ocorrem flutuações imprevisíveis impostas regularmente aos parâmetros metabólicos causando lesões, doenças ou aberrações fisiológicas (SHAO *et al.*, 2008). A flexibilidade do metabolismo permite o desenvolvimento de um grupo de respostas às mudanças ambientais, que ficam dentro de faixas de flutuação diárias ou mesmo sazonais, por isso, a variação de um fator em relação a sua condição ótima não resulta obrigatoriamente em estresse (AGARWAL *et al.*, 2013).

As condições ambientais frequentemente encontradas nas áreas utilizadas para a agricultura, apresentam, muitas vezes, fatores ou conjunto de fatores causadores de estresse em várias espécies de plantas, os quais são responsáveis pelas reduções da produtividade real em relação à produtividade teórica esperada. Alguns fatores como o conteúdo de água no solo, podem levar dias ou até semanas para serem detectados. Já o fator temperatura do ar, pode se tornar estressante em alguns minutos, enquanto outros

como as deficiências nutricionais na planta necessitam de meses para se manifestar visivelmente (SOBREIRA, 2009).

Várias ações humanas têm acentuado os fatores de estresses existentes (HUBICK *et al.*, 1986; TANJI, 1990). Se a tolerância aumenta como consequência de exposição anterior ao estresse, diz-se que a planta está aclimatada. A aclimação pode ser distinguida da adaptação, que em geral se refere a um nível de resistência geneticamente determinado, adquirido por um processo de seleção durante muitas gerações (GUPTA & HUANG, 2014).

No nordeste brasileiro há muitas áreas salinizadas e em processo de salinização, principalmente pelo cloreto de sódio, o que na maioria das vezes além da mineralização deve à utilização de água com elevados teores de sais ou a práticas de irrigação ineficientes, principalmente quando são empregadas lâminas d'água em quantidades inferiores às ideais para as necessidades de cada tipo de solo (FERREIRA, 1998), bem como, as adubações e a mineralização inerente às rochas tem contribuído para a salinização dos solos (SILVA, 1999).

Nas regiões áridas e semi-áridas geralmente este problema é agravado, pois as precipitações são inferiores a quantidade necessária para lixiviar os íons minerais das camadas superficiais do solo, onde é encontrada a maior densidade radicular (ZHANG *et al.*, 2014), e o excesso de sais no solo leva a condições que podem gerar estresses salino (YOKOI *et al.*, 2002).

As aclimações aos estresses ambientais resultam de eventos integrados que ocorrem em todos os níveis de organização, desde o anatômico e morfológico ao celular, bioquímico e molecular. As respostas da célula ao estresse incluem mudanças no ciclo e na divisão celular, mudanças no sistema de vacuolização, bem como alterações na arquitetura da parede celular. Estas reações existem para contornar os efeitos potencialmente prejudiciais causados por uma vasta gama de fatores abióticos e bióticos, incluindo a luz, a seca, salinidade e altas temperaturas (HADIARTO & LAM-SON, 2011).

A membrana plasmática é a barreira inicial e também onde se localizam os primeiros sensores para a detecção das concentrações externas de sais. A salinidade na rizosfera ocasiona alterações na permeabilidade da membrana, alterações na composição lipídica, alterações no potencial elétrico e nas atividades das enzimas ligadas a membrana (GUPTA & HUNG, 2014).

Concentrações externas elevadas de NaCl (dependendo da sensibilidade de cada espécie e/ou cultivar) limitam ou mesmo inibem o crescimento das plantas, exercendo tanto estresse osmótico como estresse iônico. Estresse osmótico é causado principalmente por déficit hídrico nos tecidos vegetais, impedindo a expansão celular. Já o estresse iônico é causado pela acumulação de íons de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e pela a perturbação da razão de  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  em células de plantas (BLUMWALD, 2000; BLUMWALD *et al.*, 2000). Os íons de  $\text{Na}^+$  podem não apenas diminuir a absorção de potássio pelas raízes, mas também agir causando toxicidade enzimática quando em níveis elevados no citoplasma (HASEGAWA *et al.*, 2000). Nas células vegetais, o  $\text{Na}^+$  é absorvido de forma passiva, já sua excreção e compartimentalização são processos ativos, mediados pelos transportadores do tipo antiporte ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) presentes no tonoplasto e na membrana plasmática. Estes transportadores secundários são acionados pelo gradiente de  $\text{H}^+$ , que por sua vez estão diretamente associados ao gradiente eletroquímico (BLUMWALD *et al.*, 2000). Em tonoplastos, as bombas de próton:  $\text{H}^+$ -ATPases vacuolares (tipo V) e pirofosfatase vacuolar (V-ADPG) desempenham papéis fundamentais no transporte de compostos nocivos para o interior do vacúolo e na regulação da pressão de turgescência, do pH citosólico, da homeostasia e atuam também no armazenamento de metabólitos primários e secundários (CHINNUSAMY *et al.*, 2006).

A remoção de sódio do citoplasma ou sua compartimentação em vacúolos é crucial para o crescimento em solos salinos, pois esse tipo de estresse desequilibra a homeostase iônica (HAUSER & HORIE, 2010). A atividade das bombas de prótons ligadas à membrana plasmática é frequentemente reforçada pelo mecanismo de resposta associado a elevação na concentração de NaCl, embora alguns trabalhos relatem que a salinidade pode atuar como inibidora ou sem efeito sobre a atividade dessas bombas (JANICKA-RUSSAK *et al.*, 2007)

Em condições de estresse salino, ocorre uma inversão do potencial hídrico entre solo e as células das raízes, que acarreta numa redução das entrada de água pelo sistema radicular, isto leva a redução do crescimento e em casos mais severos a morte da planta (BOURSIAC *et al.*, 2005), foi observado também um desbalanço metabólico na planta (entre as atividades anabolizantes e catabolizantes) quando esta é submetida ao estresse salino, bem como um redirecionamento dos processos biossintéticos levando ao acúmulo de poliois, açúcares não redutores e alguns aminoácidos (GORHAM, WYN & MCDONNELL, 1985).

O estresse salino também apresenta como um dos seus efeitos negativos a toxicidade iônica pelo excesso de íons sódio no citoplasma, este processo, pode levar a redução na absorção de íons potássio, que está associado a ativação e regulação de algumas enzimas intracelulares (FLOWERS & LAUCHLI, 1983; MURGUIA, BELLÉS & SERRANO, 1995). A fotossíntese também é prejudicada pelo excesso de  $\text{Na}^+$  intracelular (TSUGANE *et al.*, 1999), porém, a planta tenta reduzir este efeito deletério do acúmulo de íons sódio, acumulando estes íons nas raízes, para tentar evitar que ocorram alterações na razão  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  das folhas (SHI *et al.*, 2002; REN *et al.*, 2005; SUNARPI *et al.*, 2005).

O estresse salino faz com que a planta aumente o consumo de ATP, permitindo que a célula possa realizar sua osmorregulação, a qual muitas vezes requer síntese de substâncias como prolina e a betaína. Este mesmo estresse também causa inibição da fotossíntese, produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) e toxicidade iônica (HASEGAWA *et al.*, 2000). Estes desafios de aclimação podem se dar em concentrações relativamente baixas de sal, no entanto, algumas espécies de plantas podem tolerar elevados teores de sal, outras são dependentes de solos salinos (halófitas) para conseguirem complementar seu ciclo biológico eficientemente (GUPTA & HUNG, 2014).

Em algumas plantas o excesso de sódio é liberado radicularmente, outras compartimentalizam o sódio dentro do vacúolo para minimizar o dano causado pelo excesso de sódio citosólico (SOBREIRA, 2009; OLIVEIRA, 2007; OTOCH, 1999).

Em concentrações celulares elevadas o  $\text{Na}^+$  causa redução no crescimento vegetal, diminuição da produtividade, retardamento do início do ciclo reprodutivo e redução do período reprodutivo (PARIDA & DAS, 2005).

### **3.2.1 Os mecanismos de aclimação ao estresse salino**

A salinidade leva a um aumento da concentração intracelular de íons e por causa disso, as plantas tendem a reduzir o crescimento e a quantidade de matéria seca. Somado a isso, elas tentam manter alta a razão  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ , através do processo de compartimentalização de íons no vacúolo para redução do potencial osmótico (HOPKINS, 1999), a salinidade pode levar também ao ajustamento osmótico,

caracterizado pela acumulação de solutos nas células, processo pelo qual o potencial hídrico pode diminuir sem que haja diminuição na turgidez, os sais inorgânicos são armazenados no vacúolo de forma a não interferirem com o metabolismo do citoplasma. Os orgânicos (polióis, carboidratos solúveis, proteínas, prolina e betaína) que não interferem com o metabolismo, são chamados solutos compatíveis e são acumulados no citoplasma de forma a manter o equilíbrio hídrico entre o vacúolo e o citoplasma (SILVA *et al.*, 2013).

A salinidade induz a um estresse osmótico, o qual é um declínio da entrada de água resultante do aumento da pressão osmótica externa, sendo caracterizado por distúrbios fisiológicos gerados por desequilíbrio iônico no citoplasma das células vegetais (GREEWAY, 1980; FLOWERS *et al.*, 1977; CHINNUSAMY *et al.*, 2006). O efeito de toxicidade iônica é preponderante sobre os prejuízos causados pelo efeito osmótico (MUNNS, 2008), por isso, no estudo do estresse salino é preciso ser muito criterioso na determinação das concentrações de  $\text{Na}^+$  para que a planta realmente seja estressada.

As células vegetais podem se ajustar ao estresse osmótico através de alterações na pressão osmótica interna, um processo que é facilitado pelo acúmulo de solutos no vacúolo (SOBREIRA, 2009). O ajuste osmótico é também uma resposta fundamental da célula ao estresse salino. Para este ajustamento é preciso sintetizar substâncias como: prolina, betaína, proteínas, polióis e carboidratos solúveis, para que ocorra o balanceamento com a pressão osmótica no citoplasma, assim gerando no vacúolo um equilíbrio homeostático (SILVA *et al.*, 2013; LONE *et al.*, 1987; BINZEL *et al.*, 1987). A síntese desses solutos compatíveis não tóxicos é energeticamente dispendiosa para a célula (TESTER & DAVENPORT, 2003).

Podemos mencionar como consequência do estresse salino e/ou osmótico: a desorganização da membrana, a formação de espécies reativas de oxigênio, a toxicidade metabólica por inibição competitiva nos transportadores iônicos de membrana, a inibição da fotossíntese (FARIAS *et al.*, 2009) e a redução na aquisição de nutrientes, a planta não irá absorver água, e conseqüentemente nutrientes, devido à condição de estresse hídrico, sendo este processo também denominado de seca fisiológica (DIAS & BLANCO, 2010).

A salinidade afeta negativamente a absorção de água pelas raízes. A presença de sais na solução do solo acarreta em uma diminuição do potencial hídrico externo (EPSTEIN & BLOOM, 2006), o aumento da pressão osmótica causado pelo excesso de

sais solúveis na solução do solo, poderá atingir um nível em que as plantas não terão capacidade suficiente para superar o potencial osmótico do solo. O estresse salino altera os processos de absorção, transporte, assimilação e distribuição de nutrientes na planta (FARIAS *et al.*, 2009), interfere no potencial hídrico do solo, reduzindo o gradiente de potencial entre o solo e a superfície da semente, restringindo a captação de água pela semente, e reduzindo as taxas de germinação (LOPES & MACEDO, 2008).

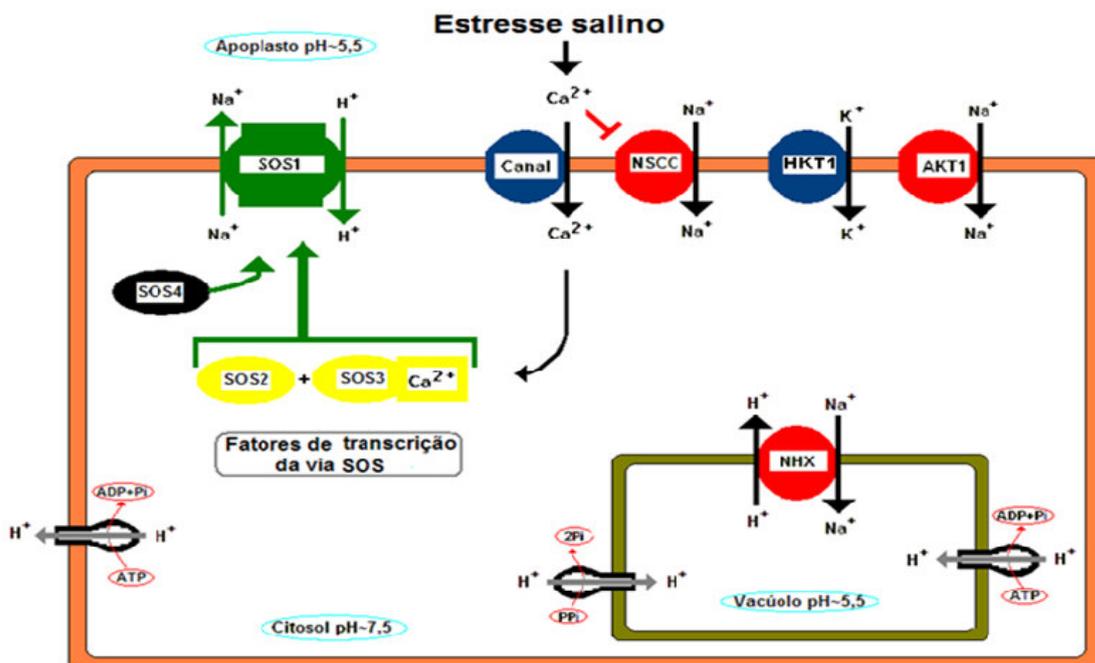
Estas alterações comprometem o crescimento e o desenvolvimento das plantas, podendo leva-las à morte e a grandes perdas nas safras (FARIAS *et al.*, 2009; HASEGAWA *et al.*, 2000; CAVALCANTE *et al.*, 2010).

Altas concentrações salinas inibem a maior parte das enzimas, por causarem perturbações no balanço hidrófobo-eletrostático entre as forças que mantêm a estrutura das proteínas (QUEIRÓS *et al.*, 2009). Os Íons cloreto por sua vez podem interferir nos sítios aniônicos envolvidos na ligação entre mRNA e metabólicos aniônicos, como bicarbonato, carboxilatos e açúcares fosfato (SERRANO, 1996).

Um dos grandes problemas da toxicidade do  $\text{Na}^+$  é causado principalmente pela similaridade encontrada nas propriedades físico-químicas entre os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , associados ao padrão competitivo pelo sítio de ligação, o que interfere em processos metabólicos chave no citoplasma como reações enzimáticas, síntese de proteínas e funções do ribossomo, acarretando na perda da integridade celular (TESTER, DAVENPONTE, 2003; OLIVEIRA, 2007; SHABALA & CUIN, 2007).

Alguns pesquisadores têm demonstrado que muitos dos mecanismos utilizados pelas plantas para aclimatar-se aos estresses abióticos são ativados constitutivamente durante toda a vida da planta. No entanto, podem apresentar diferentes níveis de transcrição em decorrência das pressões ambientais. Assim, a maioria das pesquisas focadas em estresses abióticos estão direcionadas em entender quais são os fatores envolvidos nessa ativação da transcrição diferenciada (NAKASHIMA *et al.*, 2009).

Para sobreviver em ambientes salinos as plantas adotam estratégias que as possibilitem conviver com altas concentrações de  $\text{Na}^+$ , estas estratégias são: a exclusão e a compartimentalização vacuolar (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema ilustrativo dos principais mecanismos envolvidos na regulação da concentração de sódio citoplasmático, quando a célula vegetal é submetida ao estresse salino (elaboração do autor).

No mecanismo de exclusão temos a participação das  $H^+$ ATPases de membrana plasmática e da via SOS (salt overly sensitive), respectivamente gerando a força próton motora e o sistema de transporte do  $Na^+$  do citosol para o apoplasto. Para o processo de compartimentalização, a força próton motora é gerada por duas bombas de prótons as Pirofosfatases e a  $H^+$ -ATPases vacuolar, o transporte de  $Na^+$  será realizado pelas NHX (BLUMWALD *et al.*, 2000).

Para realizar a compartimentalização vacuolar a célula depende das bombas de prótons vaculares (pirofosfatases e  $H^+$ -ATPases tipo V), que são responsáveis pela produção do gradiente eletroquímico que realiza a energização necessária para o funcionamento do contra-transportador de  $H^+/Na^+$  vacuolar denominado de NHX (Natrium Próton Exchange) (SILVEIRA *et al.*, 2010).

Na exclusão do sódio do citoplasma para o meio externo, são necessários dois componentes: a Via SOS (*Salt Overly Sensitive*) e as  $H^+$ -ATPases tipo P (QIU *et al.*, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2010; GUPTA & HUANG, 2014).

A via SOS, forma o sistema ativação e contra-transporte de sódio para o apoplasto e de prótons para o citoplasma, as  $H^+$ -ATPases de membrana plasmática

forneem o gradiente eletroquímico requerido para o funcionamento da proteína SOS1, responsável direta pela exclusão do sódio (GUPTA & HUANG, 2014).

Existem proteínas consideradas marcadores da tolerância ao estresse osmótico, como as que protegem a integridade das membranas, controlando a homeostase iônica e hídrica, além daquelas que combatem as espécies reativas de oxigênio (HASEGAWA *et al.*, 2000).

### 3.2.2 A via SOS

Muitas rotas bioquímicas têm sido estudadas nas últimas décadas, como a via SOS (*salt overly sensitive*) que surgiu recentemente como resultado de estudos genéticos, moleculares e análises bioquímicas, mas a elucidação completa delas com a tecnologia atual ainda não foi possível (ZHU, 2000; FRAILE-ESCANCIANO *et al.*, 2010).

A via SOS está diretamente associada ao estresse salino sendo ativada principalmente por este estresse. O estresse salino induz uma sinalização característica por intermédio do cálcio (KNIGHT, 1997; ZHU *et al.*, 2003; TANG *et al.*, 2010). A diferença deste sinal de cálcio em relação aos sinais desencadeados por outros estresses como seca, frio ou outros estímulos externos, ainda não foi esclarecida, mas se sabe que o sinal causado pelo estresse salino é desencadeado de forma particular (LAUCHLI *et al.*, 2008; D'ONOFRIO & LINDBERG, 2009; OH *et al.*, 2009).

A via SOS é composta por 3 componentes principais, a SOS1, a SOS2 e a SOS3. A proteína SOS1 de *Arabidopsis sp.* tem 127 KDa (SHI *et al.*, 2000, SHI *et al.*, 2002), sendo caracterizada como um transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporte está localizada na membrana plasmática, sendo associada à tolerância ao estresse salino (SÁNCHEZ-BARRENA *et al.*, 2005). Já a SOS2 é uma proteína do tipo serina /treonina quinase que forma o complexo SOS2/SOS3 (LIU & ZHU, 1998; HALFTER *et al.*, 2000). O terceiro componente é a SOS3, uma proteína miristiolada de ligação ao cálcio, que tem a habilidade de se ligar apenas ao sinal de cálcio liberado durante o estresse salino, permitindo assim a formação do complexo SOS2/SOS3 (ISHITANI *et al.*, 2000; GUO *et al.*, 2001). O complexo SOS2/SOS3 regula o nível de expressão da SOS1 (QIU *et al.*, 2001; ZHU, 2002; OH *et al.*, 2010).

Os transportadores de íons como o SOS1, bem como sua regulação desempenham papéis cruciais na manutenção da concentração iônica intracelular ideal e

portanto na capacidade de uma planta tolerar a salinidade do meio (GUPTA & HUANG, 2014).

No tocante ao transportador SOS1, seu funcionamento depende diretamente do gradiente eletroquímico da membrana plasmática e este gradiente por sua vez tem relação direta com as H<sup>+</sup>-ATPases desta membrana (GUPTA & HUANG, 2014).

A SOS1 por si só, pode aumentar sutilmente a tolerância à salinidade em cepas mutantes de levedura (OH *et al.*, 2010). A expressão conjunta das SOS1, SOS2 e SOS3 aumenta drasticamente a resistência à salinidade em cepas de leveduras mutante (SHI, 2002; OH *et al.*, 2010).

A simples expressão constitutiva de uma SOS2 ativada também aumenta a capacidade de tolerância à salinidade conferida pela SOS1 na levedura mutante, indicando ser a atividade quinase da SOS2 suficiente para a ativação da SOS1 (SHI, 2002; OH *et al.*, 2009). A expressão constitutiva da SOS1 aumentou a tolerância à salinidade em *Populus trichocarpa* (TANG *et al.*, 2010).

Em estudos complementares realizados por Qiu *et al.* (2001) utilizando *Arabidopsis thaliana*, foi demonstrado que a quinase constitutivamente ativa (SOS2) poderia melhorar a atividade de troca Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> em vesículas de membrana plasmática purificada de *Arabidopsis thaliana* tipo selvagem. Também, nos mutantes sem *sos2* e *sos3* a atividade de troca de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> foi bastante reduzida, mas esta atividade foi recuperada até valores próximos do normal pela reativação da SOS2 *in vitro* (ZHU *et al.*, 1998; QIU *et al.*, 2001).

A SOS3 é uma proteína com motivo N-terminal miristiolado, este domínio normalmente está correlacionado com proteínas membranares. O que pode ajudar a correlacioná-la com as proteínas com as quais ela interage, como a SOS1 localizada na membrana plasmática. No entanto, nem todas as proteínas SOS3 em células vegetais estão associadas a membranas (ISHITANI, 2000). A SOS3 tem além do seu papel na tolerância a salinidade, através de uma interação com SOS2, a capacidade de interagir com outras proteínas quinase. A SOS3 interage especificamente com certas proteínas PKS (proteínas quinase), formando complexos de proteínas quinase distintas que provavelmente medeiam a sinalização do cálcio em resposta a outros estímulos (GUO *et al.*, 2001).

A SOS2 contém um domínio catalítico e um domínio regulador que interage com a SOS3 (HALFTER, 2000; LIU, 1998). Os domínios de regulação e de catálise da SOS2 interagem para manter inativo o sítio quinase na fosforilação do substrato,

provavelmente por impedir o acesso do substrato ao sítio catalítico (GUO *et al.*, 2001; QUINTERO *et al.*, 2011). Quando a SOS3 estabelece a ligação com o domínio regulamentar da SOS2 parece interromper a interação intramolecular de SOS2, abrindo o sítio catalítico (QUINTERO *et al.*, 2011).

A expressão da SOS2 constitutivamente ativada em plantas mutantes sob a ação do promotor CaMV 35S em *sos2*, faz com que as plantas voltem a apresentar o fenótipo insensível ao estresse salino no caule do mutante, mas, curiosamente, não na raiz (GUO *et al.*, 2001; CHOI *et al.*, 2011), provavelmente pela regulação mais refinada da extrusão do Na<sup>+</sup> nas raízes, revelando que ainda há muitos questionamentos em relação ao funcionamento da via SOS e da sua regulação.

Os transportadores presentes em membranas apresentam longas caudas citoplasmáticas e tem sido proposto que estas caudas funcionam como sensores dos solutos transportados. Estruturalmente, notamos que a SOS1 apresenta um extenso peptídeo projetado (cauda) para a face interna da membrana plasmática, no lado citoplasmático (SHI *et al.*, 2002; QUINTERO *et al.*, 2011).

Existe a possibilidade da SOS1 ser ao mesmo tempo um transportador e um sensor (OH *et al.*, 2009). Se for um sensor de Na<sup>+</sup>, pode controlar a ativação da SOS2 em plantas, formando um sensor de regulação, devido ao fato da SOS2 ativada poder estimular a capacidade de efluxo de Na<sup>+</sup> (SHI *et al.*, 2002).

Além de ser regulada pela ação da SOS2, a atividade da SOS1 também pode ser regulada pela SOS4. Este componente da via SOS, denominado de SOS4 catalisa a formação de piridoxal-5-fosfato, o qual é um cofator. Suspeita-se que este pode servir como um ligante para SOS1, visto que, SOS1 contém uma sequência *putativa* de ligação ao SOS4 (SHI *et al.*, 2002).

Os dados indicam que SOS3 e SOS2 regulam o efluxo de Na<sup>+</sup> pela SOS1, bem como, de forma indireta, pelos sistemas de compartimentação vacuolar por meio da regulação da NHX1, haja vista que estes sistemas também são vitais para a tolerância à salinidade (ZHU, 2001).

### **3.2.3 As H<sup>+</sup>-ATPases da Membrana plasmática**

Um das proteínas envolvidas na adaptação e na capacidade de sobrevivência e adaptação ao estresse salino são as bombas de prótons da membrana plasmática (H<sup>+</sup>-

ATPases do tipo P). A  $H^+$ -ATPase é responsável pela criação do gradiente eletroquímico envolvido na energização da membrana (gradiente este utilizado para transporte de solutos), bem como também controla alguns dos principais processos de transporte na planta, como a absorção de nutrientes da raiz e o carregamento do xilema/floema. Para a geração deste gradiente ocorre um grande consumo de energia, por isso, a  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática é a maior consumidora de ATP da célula vegetal e merece muitos estudos ligados a bioenergética (HANSTEIN *et al.*, 2011).

A membrana plasmática de células individuais pode abrigar várias isoformas de  $H^+$ -ATPases tipo-P. A razão para esta diversidade não é ainda conhecida, mas pode refletir uma necessidade específica de ATPases em momentos específicos do desenvolvimento, ou em respostas adaptativas a diferentes estresses refletindo funções especializadas (PALMGREN e CHRISTENSEN, 1994; PALMGREN, 2001).

Embora a atividade da  $H^+$ -ATPase tipo-P seja modulada por vários sinais fisiológicos, há poucos estudos de como tais fatores alteram na membrana plasmática a abundância de proteína  $H^+$ -ATPase e/ou sua expressão gênica. Ao contrário de um número de genes que codificam transportadores de nutrientes e são ativadas após a carência nutricional, os genes  $H^+$ -ATPase tipo-P mostram pouca regulação transcricional em resposta à nutrição mineral, no entanto, ainda não se sabe se o estresse salino possui efeito semelhante (GAXIOLA *et al.*, 2007).

Já foi proposto que a atividade da  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática está envolvida em outras funções fisiológicas importantes, como a abertura dos estômatos, o alongamento celular e regulação do pH celular. Contudo, a prova direta da participação da  $H^+$ -ATPase em alguns destes papéis é bastante limitada (MORTH *et al.*, 2011), pois, a forma de sugerir funções fisiológicas para a  $H^+$ -ATPase é por determinação do seu padrão de expressão gênica ou protéica em diferentes tipos celulares. Isso tem sido realizado para várias isoformas usando técnicas imunológicas ou de gene repórter e os resultados estão de acordo com as funções acima mencionadas (ARANGO *et al.*, 2003). No entanto, esses estudos também demonstraram que há uma expressão de diferentes isoformas concomitantes em alguns tipos de células, como a epiderme da raiz, células companheiras do floema e células-guarda, tornando-se complicado determinar seus respectivos papéis em *Arabidopsis thaliana* (EKBERG *et al.*, 2010; SPETH *et al.*, 2010).

Vários pesquisadores já mostraram que silenciar os genes de uma subfamília da H<sup>+</sup>-ATPase ou superexpressar uma isoforma constitutivamente ativada levou a um mecanismo que afeta a abertura dos estômatos, o transporte de açúcar, a fertilidade do pólen e o crescimento em meio salino, respectivamente em: tomate, *Arabidopsis*, *Populus* e pepino (GEVAUDANT *et al.*, 2007; MERLOT *et al.*, 2007; VITART *et al.*, 2001; ZHAO *et al.*, 2000).

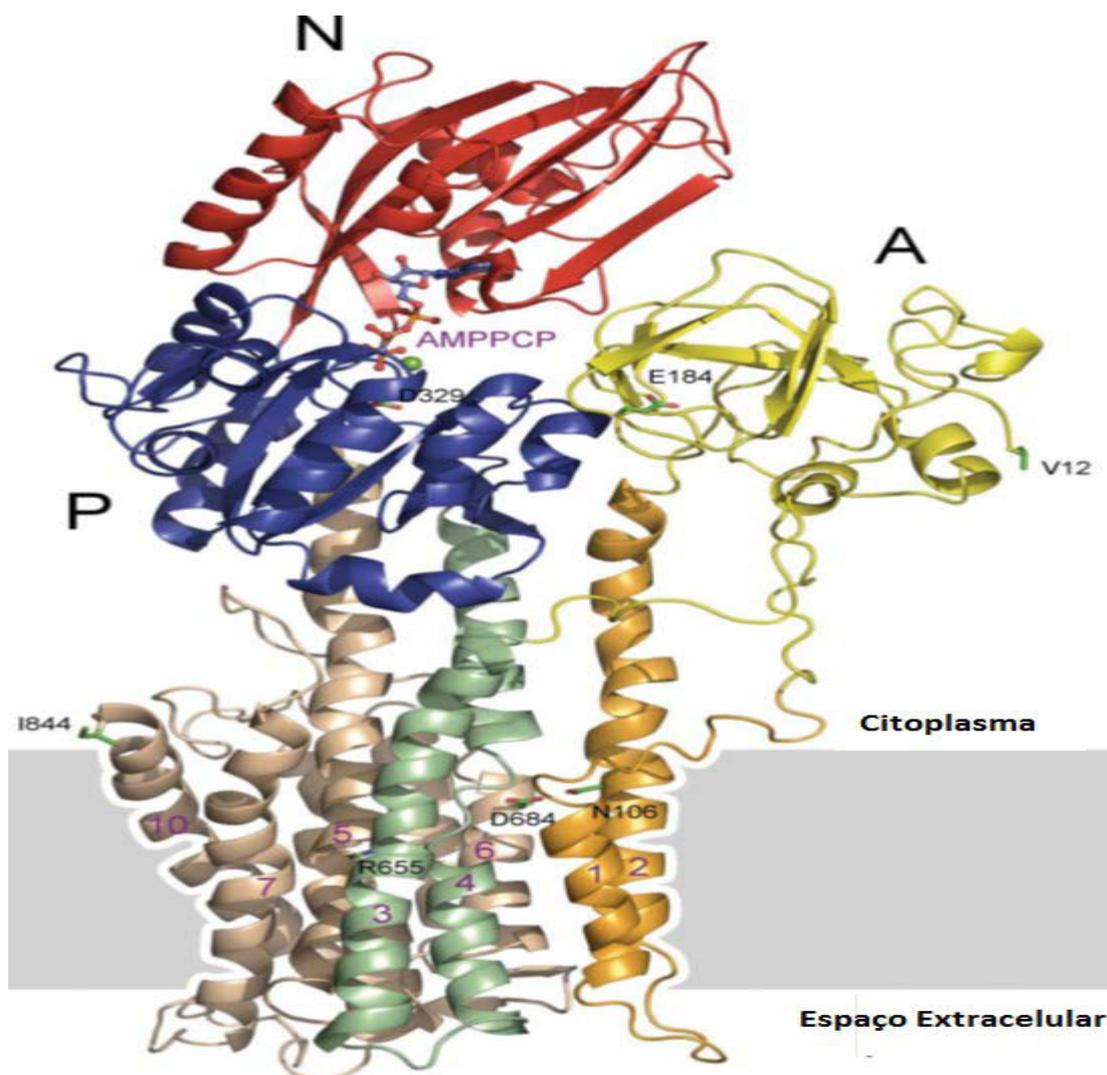
Além de íons, o transporte de compostos orgânicos, tais como os açúcares, também é dependente da atividade bombeadora da H<sup>+</sup>-ATPase. Uma redução na expressão dessa ATPase acarreta em diminuição significativa no transporte de açúcar a partir dos tecidos fotossintetizantes ou fontes para tecidos dreno, tais como raízes ou flores de pepino (ZHAO *et al.*, 2000).

As ATPase de membrana plasmática pertencem à superfamília de ATPases do tipo P que compartilham a característica de passar por um intermediário com um aspartato fosforilado durante o ciclo catalítico a qual nesse estado fosforilado elas estariam ativadas (SPERANDIO *et al.*, 2011).

Nas H<sup>+</sup>-ATPases tipo P, a subunidade mínima funcional a ser considerada é um monômero (GOORMAGHTIGH *et al.*, 1986; BRISKIN & REYNOLDS-NIESMAN, 1989), com aproximadamente 100 kDa (BRISKIN & REYNOLDS-NIESMAN, 1989; OTTMANN, 2007; KANCZEWSKA, 2005).

A estrutura da H<sup>+</sup>-ATPase (Figura 3) apresenta segmentos que se projetam para o citoplasma e dez segmentos transmembrana (TM1-TM10) englobando um pequeno laço entre TM2 e TM3 e um grande laço entre TM4 e TM5 (DUBY & BOUTRY, 2009; EKBERG *et al.*, 2010).

A H<sup>+</sup>-ATPase de *Arabidopsis thaliana* denominada de *AHA2* H<sup>+</sup>-ATPase também foi cristalizada e revelou ser uma proteína dimérica (ALSTERFJORD *et al.*, 2004). Recentemente foi obtida a estrutura tridimensional da isoforma da *AHA2* destituída de seu domínio C-terminal de regulação (PEDERSEN, 2007).



**Figura 3.** A estrutura representa uma forma ativa da bomba de prótons, sem o C-terminal auto-inibidora, complexada com Mg-AMPPCP. Com as dez hélices transmembrana, laranja, verde e marrom, como indicado; sítio de ligação a nucleotídeo domínio (N), o vermelho, o domínio de fosforilação (P), azul, e o domínio actuador (A), amarelo. Mg-AMPPCP se encontra na interface entre os domínios N e P e é mostrado como um A. A caixa cinza retrata a localização aproximada da membrana plasmática (EKBERG *et al.*, 2010).

Briskin (1989) mostrou que a relação entre ATP hidrolisado e transporte de prótons líquido é de 1:1, no entanto, o desacoplamento parcial entre a hidrólise de ATP e transporte de prótons, já foi sugerido por Morsomme *et al.* (2002). Há suspeita de que o próton seja transportado como um íon hidrônio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ). Esta suspeita se deve ao fato do tamanho deste íon ser próximo ao de outros íons transportados pelas  $\text{H}^+$ -ATPase e que a enzima pode ser inibida por  $\text{D}_2\text{O}$  (BUCH-PEDERSEN *et al.*, 2006). Além disso, a

modelagem por homologia, sugere a presença de um sítio de ligação com hidrônio contribuído pelos quarto, quinto e sexto segmentos transmembranares da H<sup>+</sup>-ATPase correspondente a isoforma *AHA2* de *Arabidopsis* (BUKRINSKY *et al.*, 2001).

Segundo Bukrinsky *et al.* (2001), os segmentos da membrana 4, 5 e 6 definem uma cavidade na região intramembranar com resíduos polares e carregados, capaz de acomodar cerca de 12 moléculas de água.

A enzima passa por dois estados conformacionais E1 e E2, que apresentam diferenças na afinidade pelo próton e na reatividade pelo ATP. No estado E1, ocorre alta afinidade pelos H<sup>+</sup> e pelo ATP. Após a hidrólise a energia liberada causa alterações conformacionais para o estado E2, que tem uma fosforilação na sua estrutura e menor afinidade por H<sup>+</sup>, sendo os mesmos liberados no meio extracelular. O próton atinge o sítio de ligação através de uma via localizada entre os segmentos transmembrana 1, 2 e 4. Após a mudança conformacional da enzima (transição E1-E2), a cavidade é aberta e o próton é liberado no ambiente externo (MORSOMME *et al.*, 2002)

Em leveduras e plantas, os domínios de regulação (R-domínios), inibem a atividade da enzima. Eles não compartilham nenhuma sequência com identidade significativa e são de diferentes comprimentos, sugerindo que evolutivamente são diferentes, sendo portanto, uma boa região para diferenciar as várias isoformas. Contudo, ambos têm pelo menos um resíduo fosforilável na região C-terminal, que quando fosforilados desencadeia a ativação da enzima (DUBY & BOUTRY, 2009). Durante a atividade da H<sup>+</sup>-ATPase, a fosforilação do penúltimo resíduo, uma Treonina, dispara a ligação de proteínas reguladoras deslocando o domínio inibidor R, ativando a enzima. A regulação por fosforilação e desfosforilação da H<sup>+</sup>-ATPase, resulta na ativação ou inibição da enzima respectivamente (GEVAUDANT *et al.*, 2007).

O domínio regulador contém dois *clusters*, RI e R-II, que têm sido sugeridos para manter a enzima com um nível baixo de atividade. Estes *clusters* foram identificados pelo rastreamento genético de mutações da isoforma *PMA2* da H<sup>+</sup>-ATPase de *Nicotiana plumbaginifolia* que melhorou a atividade (LEFEBVRE *et al.*, 2004). Mutações destes dois grupos de aproximadamente 20 resíduos, separados por aproximadamente 20 resíduos, aumenta a atividade da enzima, provavelmente, impedindo a ligação destes domínios ao resto da enzima e/ou permitindo uma melhor acessibilidade do C-terminal de fosforilação (EKBERG *et al.*, 2010).

Plantas transgênicas têm sido utilizadas para melhor demonstrar o papel do H<sup>+</sup>-ATPase (MERLOT *et al.*, 2007). Contudo, o grande número de isoformas expressas em

alguns tipos de células tornam a análise inconclusivas, pois essas plantas ou não mostram um fenótipo ou mostram um fenótipo pleiotrópico muito forte como em *Arabidopsis* (PALMGREN, 2001). O silenciamento gênico nesta mesma espécie, tem mostrado muitas vezes que a inibição de um único gene de uma isoforma, gera uma ação regulatória distinta com o intuito de compensar a isoforma silenciada (ARANGO *et al.*, 2003).

Exposição de calos de *Populus euphratica* ou *Medicago sp.* ao sódio levou a um aumento da expressão de H<sup>+</sup>-ATPase e de sua atividade (YANG *et al.*, 2007; SIBOLE *et al.*, 2005). A superexpressão em tabaco de uma *PMA4* constitutivamente ativada (formado pela exclusão de seu domínio C-terminal inibitório) aumentou a atividade de bombeamento de prótons na membrana plasmática, resultando em uma maior tolerância ao estresse salino da planta, a ativação da H<sup>+</sup>-ATPase também provoca um aumento no gradiente do potencial transmembranar, que é crítico para a manutenção da pressão osmótica, que depende, em parte do transporte ativo de íons (VAN VOLKENBURGH, 1999).

O mecanismo de ativação da H<sup>+</sup>-ATPase envolve a fosforilação do penúltimo resíduo (treonina) e a ligação de proteínas 14-3-3. No entanto, a identificação do complexo H<sup>+</sup>-ATPase/14-3-3 em estudos *in vivo* na planta ainda é difícil de ser evidenciado, sendo que a ligação só pode ser identificada nas células guarda sob a incidência de luz azul de ativação (KINOSHITA & SHIMAZAKI, 1999, 2002; YANG *et al.*, 2010). O fato da H<sup>+</sup>-ATPase estar envolvida em diversas funções fisiológicas sugere a existência de múltiplas funções de regulação (DUBY & BOUTRY, 2009).

As H<sup>+</sup>-ATPases tipo-P são importantes agentes moleculares que determinam o controle e aquisição de nutrientes às plantas e o particionamento desses elementos nos diferentes tecidos (ARANGO *et al.*, 2003; PALMGREN, 1998; PALMGREN, 2001; SONDERGAARD *et al.*, 2004).

Onze genes que codificam para H<sup>+</sup>-ATPases tipo-P (AHA1-11) foram identificados em *Arabidopsis thaliana* cujas sequências podem ser encontradas no GenBank (Tabela 1). A expressão gênica de cada membro dessa família de H<sup>+</sup>-ATPases foi estudada em *Arabidopsis thaliana*. Dois genes, *AHA1* e *AHA2*, por serem constitutivos em plantas parecem funcionar como genes necessários para a homeostase iônica. *AHA1* é encontrado no caule, enquanto que *AHA2* é predominantemente expresso nas raízes, principalmente nos pêlos radiculares (GAXIOLA *et al.*, 2007). *AHA3*, *AHA4* e *AHA11* também são bem expressos em toda a planta, mas não com a

mesma intensidade. Algum grau de especialização é visto com *AHA4* que tem alta expressão na endoderme da raiz de acordo com estudos usando gene repórter (VITART *et al.*, 2001).

**Tabela 1.** Relação dos genes das H<sup>+</sup>-ATPases de membrana de *Arabidopsis thaliana*

Nº de acesso	Nome do gene	Representação do gene no texto
P20649/AC003673	At2g18960	<i>AHA1</i>
P19456/AL161576	At4g30190	<i>AHA2</i>
P20431/AB019233	At5g57350	<i>AHA3</i>
Q9SU58/AL049658	At3g47950	<i>AHA4</i>
Q9SJB3/AC006954	At2g24520	<i>AHA5</i>
Q9SH76/AC007662	At2g07560	<i>AHA6</i>
Q9LY32/AL163852	At3g60330	<i>AHA7</i>
Q9M2A0/AL138640	At3g42640	<i>AHA8</i>
Q42556/AC011713	At1g80660	<i>AHA9</i>
Q43128/S74033	At1g17260	<i>AHA10</i>
Q9LV11/AB020751	At5g62670	<i>AHA11</i>

Análises de genes repórter mostram que o promotor da *AHA3* é ativo em células companheiras do floema da folha (DEWITT *et al.*, 1991). Padrões de expressão de *AHA5* (pouco expressa em toda a planta), *AHA6*, *AHA9* (predominantemente expresso em anteras), *AHA7*, *AHA8* (expressa quase exclusiva do pólen) e *AHA10* (maiores níveis de transcrição em siliques) sugerem que as proteínas codificadas por esses genes têm funções especializadas (BAXTER *et al.*, 2005). *AHA1*, *AHA2*, *AHA3* e *AHA11* são os transcritos mais importantes do grupo das H<sup>+</sup>-ATPase tipo-P encontrados nas folhas (ALSTERFJORD *et al.*, 2004).

As isoformas *AHA1*, *AHA2*, *AHA4* e *AHA11* também foram detectadas na maioria dos tecidos estudados (SHAHOLLARI *et al.*, 2004; SAZUKA *et al.*, 2004; NÜHSE *et al.*, 2004; NÜHSE *et al.*, 2003; NELSON *et al.*, 2006; ALEXANDERSSON *et al.*, 2004). Esses dados reforçam que estas isoformas correspondem aos principais transcritos da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática em plântulas e folhas.

Usando uma abordagem proteômica todas as isoformas, exceto *AHA8*, foram detectadas em cotilédones (SHAHOLLARI *et al.*, 2004; SAZUKA *et al.*, 2004), plantas inteiras (NÜHSE *et al.*, 2003; NÜHSE *et al.*, 2004), folhas ou ramos (NELSON *et al.*, 2006; ALEXANDERSSON *et al.*, 2004).

Um alelo dominante mutante de *AHA4*, que em princípio poderia influenciar outras isoformas na mesma célula, dá origem à maior sensibilidade ao sal (ALSTERFJORD *et al.*, 2004), sugerindo um papel para esta bomba no controle da homeostasia iônica na endoderme, que poderia estar relacionado ao controle da ascensão do sódio para a parte aérea.

Um grande número de sinais externos resultam em mudanças na atividade H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática em vesículas isoladas após diversos tratamentos como estresse salino como sinal ativador, a baixa temperatura, e o esgotamento de açúcares, como sinais inibidores (GAXIOLA *et al.*, 2007).

Alterações nos níveis de transcrição estão muitas vezes dissociados das alterações correspondentes na atividade protéica e/ou fluxos de solutos. Logo, é provável que as modificações pós-transcricionais das H<sup>+</sup>-ATPases de membrana plasmática, alterem a atividade desta bomba e por conseguinte do desenvolvimento da planta (HAGER *et al.*, 1991).

Sal e/ou estresse hídrico aumentaram o nível de expressão dos genes da H<sup>+</sup>-ATPase tipo-P em varias espécies como: arabidopsis, soja, pepino e tomate (MITO *et al.*, 1996; MAATHUIS *et al.*, 2003; SANTI *et al.*, 2005; SHEM *et al.*, 2005).

Sem a próton ATPase tipo P, o gradiente eletroquímico de membrana plasmática não poderia ser estabelecido. Considerando que este gradiente é responsável pelo funcionamento de alguns transportadores de membrana plasmática como o transportador SOS1 (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>) (MUNNS & TESTER, 2008), um aumento na atividade de SOS1 deve estar associado a um aumento na atividade da H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática.

### **3.2.4 As bombas de prótons vacuolares**

Os vacúolos são organelas encontradas predominantemente em vegetais, onde desempenham várias funções associadas principalmente a compartimentalização e armazenamento de solutos, contribuindo para a regulação osmótica da célula, mais

especificamente do citoplasma. Em condições de estresse salino o vacúolo tem importante função na manutenção da homeostasia iônica do citoplasma, tendo em vista que os íons  $\text{Na}^+$  podem ser compartimentalizados nessa organela através de transportadores específicos (GUPTA & HUANG, 2014).

Nos vacúolos vegetais já foram descritos dois grupos de bombas de prótons: as pirofosfatases que utilizam como substrato o pirofosfato e as próton ATPases, que utilizam o ATP como substrato (GUPTA & HUANG, 2014).

Frequentemente, as plantas apresentam vias metabólicas paralelas que usam tanto nucleotídeos quanto pirofosfato como fontes alternativas de energia. Essa maior versatilidade das plantas em relação aos mamíferos deve-se à presença destas duas bombas funcionando em paralelo em tonoplastos. A próton ATPase está presente nos eucariontes e a pirofosfatase (PPase) têm sido encontrada em todas as plantas e em algumas procariontes (REA & POOLE; 1993).

Algumas hipóteses são sugeridas para a existência de duas bombas numa mesma membrana: a) a V-PPase funcionaria como uma alternativa (“back-up”) para a V-ATPase em condições em que o fornecimento de ATP fosse limitado; b) que a V-PPase é reversível e pode usar o gradiente de  $\text{H}^+$  que se estabelece através do tonoplasto para sintetizar  $\text{PPi}$ ; ou c) que a energia livre, dissipada como calor por uma PPase solúvel, pode ser conservada como gradiente de prótons se a V-PPase funcionar como bomba *in vivo* (LEIGH *et al.*, 1992).

Para o seu correto funcionamento é necessária a formação de um gradiente eletroquímico ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) entre o lado interno (condição ácida do suco vacuolar) e externo da membrana vacuolar (tonoplasto). Este gradiente é gerado pelas bombas de prótons vacuolares, que são as Pirofosfatases (V-Ppases) e as próton atpases vacuolares ( $\text{H}^+$ -ATPase tipo V). Estas bombas de prótons utilizam dois substratos distintos, o pirofosfato ( $\text{PPi}$ ) para a atividade das V-Ppases e o ATP para o funcionamento da ATPase vacuolar (OTOCH, 1999; OHTA *et al.*, 2002), no entanto, ambas bombas de  $\text{H}^+$  atuam exercendo a mesma função. Já foi constatado que o estresse salino aumenta a atividade das V-Ppases e das  $\text{H}^+$ -ATPase tipo V (OTOCH, 1999), mas, alguns autores também reportaram que o estresse salino reduz a atividade destas bombas (WANG *et al.*, 2000). Uma regulação diferenciada entre elas, onde o estresse salino acarretou um

aumento da atividade da H<sup>+</sup> ATPase vacuolar e uma redução da atividade das V-Ppases em hipocótilos de feijão de corda também foi observada (OTOCH, 1999).

As enzimas de bombeamento de prótons vacuolares participam de importantes processos no vacúolo: atuando na regulação da pressão de Turgor, na manutenção do pH citoplasmático, na homeostase iônica e no armazenamento de metabólitos secundários. As ATPase tipo V são as principais bombas de prótons encontradas em células maduras, enquanto que, as pirofosfatases são as mais importantes encontradas em células vegetais jovens (AGARWAL *et al.*, 2013).

#### **3.2.4.1 H<sup>+</sup>-ATPases tipo V (vacuolares)**

As H<sup>+</sup>-ATPases tipo V (V-ATPases), também conhecidas como próton ATPases vacuolares, receberam esta denominação por terem sido inicialmente identificadas em tonoplastos, mesmo tendo sido depois identificadas em outros sistemas de endomembranas a denominação ainda permanece. As V-ATPases representam uma classe única de H<sup>+</sup>-ATPases por terem um pH ótimo neutro em lugar de alcalino e por apresentarem um padrão de inibidores distintos. Elas são insensíveis a azida (BARKLA & PANTOJA, 1996; OTOCH, 1999) e mais sensíveis do que as F-ATPase (ATP sintases) (PÁNKE *et al.*, 2000) ao nitrato, a bafilomicina A e Concanamicina C (AGARWAL *et al.*, 2013).

As V-ATPase são enzimas encontradas em fungos e plantas, com multi subunidades compostas por dois complexos: o complexo periférico V1 consiste de oito subunidades (A, B, C, D, E, F, G e H) responsável pela hidrólise do ATP, e o complexo integral de membrana V0, este apresenta seis subunidades (a, c, c', c'', d e e) responsável pela translocação de prótons (GAXIOLA *et al.*, 2007). Contudo, o modelo estrutural baseado em microscopia eletrônica, das V-ATPase provenientes de células eucarióticas de plantas e das subunidades individuais determinadas por cristalografia de raio-X mostrou que a estrutura geral da V e F-ATPase é marcadamente similar sugerindo que elas podem também ter molde estrutural comum (GAXIOLA *et al.*, 2001).

Em plantas, como em todos os eucariotos superiores, há muitas subunidades da V-ATPase que são codificadas por famílias de genes. Em *Arabidopsis*, 13 subunidades (nenhuma c' é encontrada em plantas) são codificadas por um total de 27 VHA-genes e

se todas as combinações de isoformas fossem usadas teríamos centenas de complexos da V-ATPase (SZE *et al.*, 2002 apud GAXIOLA, 2007).

Os “componentes principais” (subunidade A, B e C) têm sido localizados em todas as ATPases tipo V estudadas, sugerindo que essas subunidades seriam essenciais para o seu funcionamento. As outras subunidades vistas na literatura foram isoladas somente em algumas espécies. As diferenças na composição de subunidades entre as V-ATPase de plantas sugerem que a composição das subunidades pode ser específica do tecido ou regulado pelo meio ou pelo desenvolvimento (LÜTTGE & RATAJCZAK, 1997). Essas subunidades estão distribuídas em dois setores (V1 e V0).

Subunidade A (VHA-A): a subunidade A de várias fontes de V-ATPase já foi clonada e sequenciada e mostrou possuir uma variação em sua massa molecular de 67 a 73kDa. A subunidade A é uma subunidade catalítica, tem a função de catalisar a hidrólise do ATP. Baseado na análise do perfil de expressão, a subunidade A é um fator limitante da atividade da holoenzima e é expressa em baixo nível em condições normais, mas em condições de estresse salino a expressão pode aumentar rapidamente (ZHAO *et al.*, 2009). Ela contém um sítio de ligação ao nucleotídeo e a ligação dessa subunidade a análogos de adenina, inibe a atividade de hidrólise de ATP (LÜTTGE & RATAJCZAK, 1997). Logo ela é conhecida como sendo a subunidade catalítica da enzima.

Subunidade B (VHA-B): a subunidade B é uma subunidade regulatória e também participa da formação do sítio catalítico. A existência de múltiplas isozimas indica a complexidade e a importância dessa função regulatória, como foi refletido na mudança da expressão da subunidade B em condição de estresse salino (ZHAO *et al.*, 2009). Assim, a subunidade B possui sítio de ligação ao substrato, mas não é a subunidade catalítica. A massa molecular deduzida varia de 53,7 a 54,7 kDa (RATAJCZAK, 2000).

Subunidade C (VHA-C): a subunidade C é formada por polipeptídeos com massas moleculares aparente de 37 a 52 kDa. A função da subunidade C é estabilizar a ligação ente os domínios V1 e V0 e é induzida em diferentes estágios por estresse salino (ZHAO *et al.*, 2009).

Subunidade D (VHA-D): a subunidade D tem massa de 29,1 kDa. A subunidade D forma a eixo central da estrutura do domínio V1 e é uma subunidade essencial para o transporte de prótons e hidrólise do ATP (XU & FORGAK, 2000).

Subunidade E (VHA-E): a subunidade E é encontrada sendo parte do setor periférico ou haste sustentadora fisicamente e que promove a ligação do domínio

periférico V1 com o domínio V0 de membrana, ela é muito importante para a montagem do domínio V0 dentro da membrana (ZHAO *et al.*, 2009).

Subunidade F (VHA-F): a subunidade F participa da formação da haste central, junto com a subunidade D. Ela exerce uma importante função estabilizando a interação entre V1 e V0 (ZHAO *et al.*, 2009).

Subunidade G (VHA-G): a subunidade G é representada por um polipeptídeo de 12,5 kDa. A subunidade G pode estar envolvida no acoplamento da hidrólise de ATP e transporte de H<sup>+</sup> (RATAJCZAK, 2000). A subunidade G liga-se fortemente a subunidade E e o sal induz um aumento coordenado da expressão de ambas subunidades (ZHAO *et al.*, 2009).

Subunidade H (VHA-H): assim como a subunidade C participa estabilizando a ligação entre os domínios V1 e V0 e é induzida em diferentes estágios por estresse salino (ZHAO *et al.*, 2009).

Subunidade c (VHA-c): a subunidade c constitui a estrutura chave do domínio V0 e forma um hexâmero. É uma proteína altamente hidrofóbica contendo quatro domínios intramembrana (RATAJCZAK, 2000).

Subunidade d (VHA-d): a subunidade d é ligada firmemente com a subunidade c e participa estabilizando o corpo do domínio V0. Essas duas subunidades são induzidas por estresse salino em diferentes estágios (ZHAO *et al.*, 2009).

Evidenciando diferentes funções da V-ATPase no metabolismo celular, pode-se propor a hipótese que algumas isoformas corresponderam a genes de manutenção, enquanto que outras são expressas dentro de condições de estresses ambientais. Porém, faltam evidências para confirmar a expressão de diferentes isoformas como resposta ao estresse ambiental ou à presença de diferentes isoformas em diferentes membranas celulares (SOBREIRA, 2009).

Devido às importantes funções desempenhadas pelo vacúolo é esperado que a atividade da V-ATPase, que é a maior bomba de H<sup>+</sup> do tonoplasto, seja modulada para acompanhar as mudanças ambientais e metabólicas. Apesar da importância da enzima para energização vacuolar, estudos detalhados nas respostas da V-ATPase ao nível de transcrito de proteína e de atividade foram encontrados em condições de estresse salino (SOBREIRA, 2003).

Os níveis de mRNA das subunidades da V-ATPase e a quantidade dessa proteína são alterados em resposta aos estresses ambientais. Uma característica comum de proteínas vegetais altamente reguladas parece ser a oscilação endógena das

quantidades de transcritos e tal oscilação foi demonstrada para a subunidade c da V-ATPase de *M. crystallinum* (ROCKEL *et al.*, 1997).

### 3.2.4.2 As Pirofosfatases

As Ppases (V-Ppases) foram inicialmente localizadas em vacúolos, daí então passaram a ser consideradas enzimas marcadoras de vacúolo (REA & POOLE; 1993).

Essa enzima mostra-se não só necessária como suficiente para o transporte de H<sup>+</sup> dependente de pirofosfato. O primeiro cDNA da V-PPase foi clonado a partir de *A. thaliana* (SARAFIAN *et al.*, 1992) através de exame imunológico de uma biblioteca de expressão. Desde então cDNAs foram clonados de várias espécies vegetais: trigo, beterraba, tabaco, arroz (SAKAKIBARA *et al.*, 1996), feijão e abóbora (MARUYAMA *et al.*, 1998).

As prótons-pirofosfatases são bombas de prótons eletrogênicas que acidificam vacúolos em células vegetais. O substrato para as PPases, e o PPI, que é um subproduto de vários processos metabólicos, como a polimerização de DNA e RNA, síntese de aminoacil-tRNA, formação de ADP-glicose e UDP-glicose, (MARTINOIA *et al.*, 2007), conversão do piruvato em fosfoenolpiruvato (MARTINOIA *et al.*, 2007).

A pirofosfatase é um polipeptídeo simples, encontrado em vários seres, porém, não foi ainda encontrado em fungos (MARTINOIA *et al.*, 2007). São proteínas altamente hidrofóbicas, consistindo de 14 a 17 domínios transmembranares  $\alpha$ -hélice, com massa molecular de aproximadamente 80 kDa e sua função está associada à geração de um gradiente de prótons através de endomembranas usando a energia da ligação do fosfoanidrido das moléculas de pirofosfato (PPI) (MARTINOIA *et al.*, 2007).

Em plantas, foram identificados dois tipos filogeneticamente distintos de V-PPase: tipo I, dependente de K<sup>+</sup> citosólico para a sua atividade e são moderadamente sensíveis à inibição por Ca<sup>2+</sup>, e a do tipo II, que são insensíveis ao potássio, mas extremamente sensíveis ao Ca<sup>2+</sup> (GAXIOLA *et al.*, 2007).

No sítio catalítico das V-PPases encontramos um sítio ligante de Mg-PPI, responsável pela hidrólise do PPI e adicionalmente existem cinco voltas citoplasmáticas que são responsáveis pela conversão da energia da hidrólise, três dos quais estão frequentemente conservadas em todas as PPases (GAXIOLA *et al.*, 2007).

Normalmente, a atividade da V-PPase é maior em tecidos jovens, contudo, em alguns casos a V-PPase é também a principal bomba de próton em células de plantas maduras (MARTINOIA *et al.*, 2007).

A quantidade de V-PPase encontradas no tonoplasto varia de acordo com as condições fisiológicas e também em resposta a estresses ambientais. O mecanismo regulatório da expressão gênica da V-PPase e a regulação pós-traducional ainda requer mais estudos para sua completa elucidação (GUPTA & HUANG, 2014).

As sequências de aminoácidos das V-PPases são altamente conservadas, onde observamos que os C-terminais são relativamente conservados e podem ser cruciais na manutenção da atividade enzimática (LI *et al.*, 2008). Recentemente, Yu *et al.* (2011) mostraram que a super-expressão da pirofosfatase em *Arabidopsis*, resultou no aumento da divisão celular e no aumento do transporte de auxinas. Brini *et al.* (2007) demonstraram que plantas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas com super-expressão das bombas de prótons vacuolares V-ADPG (*TVPI*) e ou  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporte (*TNHX1*) são muito mais resistentes a altas concentrações de NaCl e ao estresse hídrico, em relação a linhagem selvagem. Estas plantas transgênicas acumularam mais  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  nas folhas do que a linhagem selvagem.

A expressão e/ou a atividade destas bombas pode ser induzida por estresse ambiental. Este tipo de regulação parece ser necessária para uma adaptação ao sal, estando associada à tolerância a esse estresse. Já foi verificado, que o estresse salino afeta a atividade da V-PPase, tanto em relação a quantidade proteica como em relação à expressão dos genes em espécies como *Suaeda salsa* e *Salicornia bigelovii* (BALLESTEROS *et al.*, 1996; FUKUDA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2006).

### 3.2.5 Os transportadores vacuolares NHX

As proteínas NHX (Natrium Proton Exchange), são consideradas como as principais envolvidas no sequestro do sódio do citoplasma para o vacúolo, para prevenir a toxicidade causada por este íon no citoplasma (APSE & BLUMWALDB, 2007). O excesso dos íons sódio são muitas vezes removidos do citoplasma, por meio de processos de compartimentalização, sendo o vacúolo o principal compartimento nas células vegetais que se presta a este fim (VOGELI-LANGE & WAGNER, 1990). Esta

compartimentalização acarreta na diminuição do desequilíbrio iônico causado pela toxicidade do íon  $\text{Na}^+$ , quando em elevadas concentrações no citoplasma, prevenindo assim sua circulação pelo citoplasma onde causaria interferência na atividade de várias enzimas (CAVALCANTE *et al.*, 2010).

Apesar do grande papel do efluxo de  $\text{Na}^+$  no metabolismo, a proporção das taxas de fluxo *versus* taxas de efluxo indica que, ao longo do tempo,  $\text{Na}^+$  acaba por, acumulam-se no citosol de células de raízes, e, eventualmente, em todos os demais tecidos da planta (APSE & BLUMWALDB, 2007). Assim, a compartimentação de íons de  $\text{Na}^+$  em vacúolos é considerada como um mecanismo fundamental para evitar o efeitos da toxicidade do  $\text{Na}^+$  no citosol, proporcionando um mecanismo de ajustamento osmótico adicional, contribuindo para a absorção da água e manutenção da pressão de turgor (APSE & BLUMWALDB, 2007). A excreção para o apoplasto, assim como a compartimentalização, provém de condições ideais no metabolismo celular, entretanto, o resultado destes distintos processos é diferente (MARTINOIA *et al.*, 2007).

As NHX, já foram descritas inicialmente como sendo, as trocadoras seletivas  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (SOBREIRA, 2009). Posteriormente, se descobriu em *Arabidopsis* uma família multigênica para este transportador, onde foi evidenciado que o gene *AtNHX1* mediava tanto o transporte de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , quanto de  $\text{K}^+/\text{H}^+$  em vesículas de tonoplasto de tomate transgênico (ZHANG & BLUMWALD, 2001).

As células de plantas tratadas com altas concentrações de sódio podem manter uma alta taxa  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  no citoplasma e controlar o balanço osmótico na célula e a acumulação de  $\text{Na}^+$  ambiental nos vacúolos (FUKUDA *et al.*, 2004). A compartimentalização do  $\text{Na}^+$  e do  $\text{Cl}^-$  no vacúolo também contribui para a manutenção do “status hídrico” da célula, juntamente com solutos orgânicos que são os principais osmólitos acumulados no citosol e nas organelas para balancear o “status” osmótico das células de plantas crescidas expostas a salinidade (YOKOI *et al.*, 2002). A NHX pode realizar a troca de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  bem como a troca de  $\text{K}^+/\text{H}^+$  em algumas condições (ZAHARAN *et al.*, 2007).

Foi observado que as NHX em condições normais de crescimento contribuem para absorção do  $\text{K}^+$ , este íon fica armazenada no interior dos tonoplastos, auxiliando na manutenção da pressão de turgor e na regulação do pH (GUPTA & HUANG, 2014). Sob efeito de estresses salinos e/ou osmótico, as NHXs exercem uma função de proteção, por meio da compartimentalização vacuolar de  $\text{Na}^+$ , e, em alguns casos, de  $\text{K}^+$ ,

desta forma, prevenindo os efeitos tóxicos de uma alta relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  no citosol (XINGYU, 2010).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção e preparo das sementes de *Vigna unguiculata***

O Laboratório de Sementes da Universidade Federal do Ceará disponibilizou sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivares Pitiúba e Setentão (100 sementes de cada cultivar), que foram multiplicadas em Neossolo, usando a adubação básica recomendada pela EMBRAPA, com irrigação diária. As sementes colhidas foram selecionadas por peneiramento para o tamanho 17 MESH (unidade de medida para seleção de sementes), visando assim a padronização dos resultados.

### **4.2 Germinação das sementes de *Vigna unguiculata***

As sementes selecionadas dos cultivares Pitiúba e Setentão, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5%, por 5 minutos para eliminação de possíveis patógenos e posteriormente, lavadas com água destilada para remoção. Em seguida, as sementes foram imersas em água destilada por um período de 30 minutos. Posteriormente as sementes foram semeadas. A germinação das sementes ocorreu em areia grossa peneirada e previamente autoclavada a 121°C por 15 minutos. As sementes (15 unidades de cada cultivar por vaso) foram distribuídas em vasos plásticos escuros (capacidade de 6 litros) contendo 4 litros de areia grossa e água destilada (capacidade de campo), estas condições foram mantidas durante 96 horas. Durante todo o período de crescimento as plantas foram mantidas na casa de vegetação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (Universidade Federal do Ceará).

### **4.3 Cultivo hidropônico de *Vigna unguiculata* e aplicação do NaCl.**

96 horas após a semeadura, em areia grossa, as plântulas foram cuidadosamente retiradas dos vasos, com o auxílio de água corrente para a remoção do substrato e transferidas para a hidroponia em solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON (1950)) a 1/4 de força por 72 horas. Ao término deste tempo, a solução foi substituída por solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON (1950)) modificada a 1/2 de força por mais 72 horas. Em seguida, as plantas foram colocadas em soluções nutritivas 1/2 de força, em ausência e presença de NaCl (0, 25, 50, 75 e 100 mM). Durante todo o período de

crescimento as plantas foram mantidas na casa de vegetação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (Universidade Federal do Ceará). Posteriormente com 120 horas após a aplicação do NaCl (plantas com 15 dias após a semeadura) o material vegetal (raízes, caules e folhas) foi coletado para a obtenção de dados morfofisiológicos e posteriormente análises bioquímicas e moleculares.

#### **4.4 Delineamento experimental**

O experimento foi realizado de forma fatorial 2X5 (2 cultivares (Pitiúba e Setentão) e 5 concentrações de NaCl (0, 25, 50, 75 e 100 mM)), sendo utilizadas 30 plantas por tratamento (n=30) de cada cultivar (300 unidades experimentais), o experimento foi conduzido seguindo um delineamento inteiramente casualizado.

#### **4.5 Análise estatística**

Para a determinação dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos foi utilizado n=30, sendo aplicado, os dados foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA) e a significância comparada, usando o teste de Tukey a um nível de confiança de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

Para as análises de expressão gênica os experimentos foram realizados em triplicatas, sendo determinado o desvio padrão.

#### **4.6 Determinação de parâmetros fisiológicos e bioquímicos**

##### **4.6.1 Determinação dos comprimentos dos diferentes órgãos**

Após 15 dias da germinação (120 horas da aplicação do estresse) os órgãos das plantas [raiz, caule e primeiro par de folhas (trifoliadas)] foram coletados. Os órgãos foram lavados, cortados e imediatamente medido o comprimento em cm para o estabelecimento da razão raiz/parte aérea.

##### **4.6.2 Estabelecimento da razão raiz/parte aérea**

Com os dados de comprimento dos órgãos das plantas [raiz, caule e primeiro par de folhas (trifoliadas)] foi posteriormente determinada a razão raiz/parte aérea.

#### 4.6.3 Determinação da área foliar

A área foliar do primeiro par de folhas trifolioladas, foi determinada utilizando-se de um medidor de superfície (LI-3100, Area Meter, Li-Cor., Inc., Lincoln, Nebraska, USA).

#### 4.6.4 Determinação do peso fresco e seco dos diferentes órgãos

Durante a coleta, os órgãos foram lavados, cortados e imediatamente pesados em balança analítica. Após este procedimento, o material foi transferido para sacos de papel furados e mantidos em estufa de circulação de ar a 70 °C até peso constante. A quantidade de água em cada órgão foi determinada através da diferença entre o peso fresco e o peso seco. Estes dados foram utilizados para estabelecer a razão massa seca da parte aérea/massa seca de raízes (MSPA/MSR).

#### 4.6.5 Determinação do percentual de água dos diferentes órgãos

Usando os dados de peso fresco e peso seco, foi possível estabelecer o percentual de água que cada órgão continha por meio das fórmulas:

$$\text{Peso de Água} = \text{Peso Fresco} - \text{Peso Seco}$$

$$\text{Peso fresco} \quad 100\%$$

$$\text{Peso de Água} \quad X$$

$$\text{Onde } X = \% \text{ de Água}$$

#### 4.6.6 Determinação da concentração de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> solúveis nos diferentes órgãos

As amostras secas dos órgãos (raízes, caule e primeiro par de folhas trifolioladas) das plantas foram maceradas usando gral e pistilo e mantidas em tubos eppendorf fechados à temperatura ambiente até a determinação do conteúdo de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> solúveis.

As 50 mg de amostras de massa seca foram adicionados a 10 mL de água deionizada a 100 °C por 60 minutos em tubos hermeticamente fechados para a extração dos íons solúveis. Após resfriamento, os extratos foram centrifugados à 3000 g por 10 min. e os sobrenatantes foram filtrados em algodão e lidos em fotômetro de chama (Micronal, modelo 462) com realização de curva de calibração de 0 a 1000  $\mu\text{mol/L}$  com soluções padrão de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , sendo realizadas as devidas diluições com água deionizada sempre que foi necessário (MALAVOLTA *et al.*, 1989). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{ms}$  de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ .

#### **4.6.7 Determinação da concentração de prolina nos diferentes órgãos**

As concentrações de prolina foram determinadas nos órgãos (raízes, caule e primeiro par de folhas trifoliadas) de acordo com o método de Bates (1973), que tem como base a reação com a solução de ninhidrina ácida (1,25 g de ninhidrina, em 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico a 6,0 M). Em tubos de ensaio com tampas rosqueadas, foram adicionados 1,0 mL do extrato celular (400 mg de tecido seco macerado em 10,0 mL de de ácido sulfosalicílico a 3%, depois centrifugado por 5 minutos), 1,0 mL de ninhidrina ácida e 1,0 mL de ácido acético glacial, sendo a mistura aquecida a 100°C, por 1 h, para o desenvolvimento da reação que gera a cor. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo por 10 min. para interromper a reação. Após o resfriamento, adicionou-se 2,0 mL de tolueno aos tubos, os quais foram agitados vigorosamente e posteriormente deixados em repouso. Após repouso e formação de uma mistura bifásica, a fase superior (cromóforo + tolueno) foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur para a quantificação de prolina, que foi realizada através de leituras de absorbância em 520 nm, sendo o tolueno usado como branco. Utilizou-se como padrão uma curva feita com L-Prolina. A concentração foi expressa em  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{ms}$ .

#### **4.6.8 Determinação da concentração de Malondialdeído nos diferentes órgãos**

Para a mensuração da concentração de Malondialdeído (MDA) que é um indicativo da peroxidação dos lipídios de membrana, foi utilizado o teste para substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico proposto por Cakmak e Horst (1991). Os

extratos iniciais foram obtidos pela maceração, por 3 min. de 1g de tecido fresco em 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. O macerado foi filtrado em tecido de náilon de malha fina e centrifugado a 15.000 g, durante 10 min. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4°C e o sobrenadante (extrato) foi armazenado a -25°C até o momento das análises. A reação ocorreu a partir da adição de 0,5 mL do extrato a 1,5 mL de uma solução de ácido tiobarbiturico a 0,5% em TCA (20%). A mistura foi incubada em banho-maria a 90°C, por 20 min., sendo a reação interrompida por meio de resfriamento dos tubos em banho de gelo. A amostra foi então centrifugada a 10.000 g, por 5 min., e o sobrenadante foi coletado para a determinação das leituras a 532 nm e a 660 nm. Os teores de MDA foram estimados através da subtração dessas leituras e utilizando-se seu coeficiente de extinção molar ( $155 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em nmol de MDA  $\text{g}^{-1}$  mf.

#### **4.7 Estudos moleculares: Caracterização e expressão de genes de proteínas envolvidas na extrusão/compartimentalização de $\text{Na}^+$**

Nesse trabalho foram estudados os genes de proteínas envolvidas na extrusão (SOS1 e  $\text{H}^+$  ATPases de membrana plasmática) e compartimentalização de  $\text{Na}^+$  (NHX, subunidade A da ATPase vacuolar e Pases vacuolares).

Foram utilizados para a normalização dos dados de expressão por RT-qPCR (PCR em tempo real) 6 genes constitutivos (*EF1 $\alpha$ 1*, *EF1 $\alpha$ 2*, *EF1 $\alpha$ 3*, *EF1 $\beta$* , *F-box*, *IDE*).

#### **4.8 Levantamento *in silico* das informações sobre os genes de interesse em *Vigna unguiculata***

Os genes de *Vigna unguiculata* foram identificados através de buscas nos bancos de dados de ESTs (etiquetas de sequência expressa) (187.487 sequências) do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e de GSS (sequências de levantamento do genoma)(cerca de 260.000 sequências) do “Cowpea genomics” (<http://cowpeagenomics.med.virginia.edu/>), usando a ferramenta BLAST e sequências homólogas de *Arabidopsis thaliana* e *Phaseolus vulgaris* como sequência de busca. As sequências dos genes de *Phaseolus vulgaris* foram anotadas previamente a partir de dados genômicos disponíveis no Phytozome (<http://www.phytozome.net/search.php>) usando *Arabidopsis thaliana* como referência. A ferramenta CAP3 foi usada para

obtenção de *contigs* a partir das sequências homologas identificadas de *V. unguiculata*. Após a identificação dos genes, deduziu-se a sequência de cDNA e estas foram traduzidas em sequências de aminoácidos através da ferramenta de tradução ExPasy (<http://www.expasy.org/>).

#### 4.9 Alinhamento das sequências e análise filogenética

Devido às H<sup>+</sup>-ATPase tipo P e NHX serem codificadas por famílias multigênicas uma análise filogenética foi necessária para a classificação de cada membro da família.

Após a identificação dos fragmentos de genes das espécies citadas anteriormente, procedeu-se a análise filogenética a partir dos cDNAs ou proteínas deduzidas de H<sup>+</sup>-ATPase tipo P e NHX. Estas sequências, juntamente com as de *Arabidopsis thaliana* da ordem Brassicales (usada como grupo externo) foram alinhadas através do programa CLUSTAL W e a relação evolucionária determinada pelo programa MEGA 5.05 empregando o método Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987) com valores de bootstrap (1.000 replicatas) (TAMURA *et al.*, 2011).

#### 4.10 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) usados para as reações de PCR em tempo real foram desenhados usando o programa Perl primer V1.1.20 (MARSHALL, 2011). Os *primers* para os genes codificadores das H<sup>+</sup>-ATPases tipo P e NHXs foram desenhados a partir da sequência 3' não traduzida (3'UTR), devido a essas regiões serem menos conservadas em comparação com a região codante que apresenta alta identidade entre suas sequências de nucleotídeos. Os *primers* para os genes codificadores das Ppases, SubA da V-ATPase e SOS1 (na junção exon/exon) foram desenhados a partir da sequência intermediárias dos genes.

Os *primers* desenhados variaram em comprimento de 19 a 23 pb, com temperatura de anelamento entre 50,5 a 61,9 °C e tamanho do fragmento a ser amplificado entre 90 a 239 bp. Os *primers* desenhados são mostrados na tabela 2.

**Tabela 2.** Primers utilizados nas análises de expressão gênica de *Vigna unguiculata* (L) através de RT-qPCR, com temperatura ótima de anelamento e tamanho dos amplicons.

GENE	PRODUTO GÊNICO	SEQUÊNCIA DO PRIMER	TEMPERATURA DE ANELAMENTO °C	TAMANHO DO AMPLICON (pb)
f-BOX	Proteína da família F-Box	F 5'GCTTATTC AATCCGCTTGTC 3'	57,5	148
		R 5'GTCCTATAACAGTTCTCCA 3'		
INSULINA SE (IDE)	Enzima degradadora de insulina	F 5'GCAACCAACCTTTCATCAG 3'	57,5	143
		R 5'TCCTTTGCTCAATGTTCCC 3'		
EF-1 $\alpha$ 1	Fator de alongação	F 5'GTGTTGAGAAGAAAGACCCA 3'	59,8	144
		R 5'CGACCATGAACCTGTAAAG 3'		
EF-1 $\alpha$ 2	Fator de alongação	F 5'GTAACAAGATGGATGCCACC 3'	61,9	90
		R 5'CCACTTCTTCAAATACGAGGAG3'		
EF-1 $\alpha$ 3	Fator de alongação	F 5'CAAGAGCGTGGAGAAGAAG 3'	59,8	135
		R 5'CAGCGTCTACAAGAAGACAC3'		
EF-1 $\beta$	Fator de alongação	F 5'GAGGATAAGAAGCGACGA 3'	59,8	96
		R 5'AGGCTTAACATCGAGTAGG 3'		
SOS1	trocadora Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> da mem. Plasmática	F 5'TCTCCATCTTCAGTTCGT 3'	57,5	144
		R 5'ATCTTGCTTTCCCACTTCAC 3'		
NHX1	Proteína trocadora Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> vacuolar	F 5'TAATGGTCATCAATGGCGT 3'	59,8	141
		R 5'AGTCACTACCCAAAGAAGT 3'		
NHX2	Proteína trocadora Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> vacuolar	F 5'GTCCAAACACTATTCGTGCC 3'	59,8	158
		R 5'CCACTGACTTACTTCTGCC 3'		
NHX3	Proteína trocadora Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> vacuolar	F 5'TTTGTGCCCTATGTTCCC 3'	57,5	159
		R 5'CCCAAACCTCTTCAATCC 3'		
NHX4a	Proteína trocadora Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> vacuolar	F 5'CTACCTTGGCTATCCCTTGAG 3'	59,8	171
		R 5'CTGTGATTGGTTATGATGAGG 3'		
NHX4b	Proteína trocadora Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> vacuolar	F 5'TCCAAAGCAACAATCAGCA 3'	57,5	129
		R 5'TTCCACCAAACACAGGTCT 3'		
NHX5	Proteína trocadora Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> vacuolar	F 5'CCAATGGTTATCTTCTCCTG 3'	57,5	186
		R 5'AGATGCAGCACTTCTTTGA 3'		
NHX6	Proteína trocadora Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> vacuolar	F 5'TCCGTCACGAATTTATAGA 3'	59,8	121
		R 5'AGATGCAGCACTTCTTTGA 3'		
Ppase1	Pirofosfatase	F 5'CTGTGGGTATTCTGTGTTGT 3'	52,7	174
		R 5'TAGTGAAGGAAGTTGGAAGT 3'		
Ppase2	Pirofosfatase	F 5'CTGATTACAAGCATGAGCCT 3'	55	184
		R 5'CCTGATTCGTCTACTAGTCCA 3'		
VatpSub-A	H <sup>+</sup> -ATPase tipo V	F 5'AATTCACCATGCTTCAGACC 3'	50,5	101
		R 5'ATGAACACAACGCTGACCA 3'		
Hatp06	H <sup>+</sup> -ATPase tipo P	F 5'TTACTAGGTAGGGAGAGGA 3'	52,7	113
		R 5'CCCAAGCATCAAAGCAAA 3'		
Hatpase18	H <sup>+</sup> -ATPase tipo P	F 5'CTTGTTTCTGCTGTCAAAT 3'	59,8	155
		R 5'TGTTCCAAAGCAAACCAATG 3'		
Hatpase20	H <sup>+</sup> -ATPase tipo P	F 5'ATTGTCCTGACCGAGCCA 3'	61,9	145
		R 5'TCAGAGCAACGAGCATGAAT 3'		
Hatpase48	H <sup>+</sup> -ATPase tipo P	F 5'TAGCAGTGTGAACATAGAGCA 3'	59,8	120
		R 5'AAGTAGACACAGAAGACACAG 3'		
Hatpase59	H <sup>+</sup> -ATPase tipo P	F 5'ACTCTGCAGTTTGTCTGA 3'	52,7	153
		R 5'AGCATAGAATACAAGGGTGA 3'		
Hatpase103	H <sup>+</sup> -ATPase tipo P	F 5'CATCCAATCAGTTCATACAG 3'	55	182
		R 5'TGAACTGATGCTAAGGAGG 3'		
Hatpase127	H <sup>+</sup> -ATPase tipo P	F 5'AGGGCATGGACAAGGAC 3'	50,5	239
		R 5'CAAGAAATGCACCTCGG 3'		
Hatpase139	H <sup>+</sup> -ATPase tipo P	F 5'GTTACTTGGCACTGATGACTA 3'	57,5	216
		R 5'GGCTGACTATACTGACTTGC 3'		
Hatpase142	H <sup>+</sup> -ATPase tipo P	F 5'GACGAAGAAAGACTCAAAGG 3'	59,8	190
		R 5'GTAACACTAGCATACCACCA 3'		
Hatpase165	H <sup>+</sup> -ATPase tipo P	F 5'CATATCATGTGGCTCTTGTAT 3'	50,5	147
		R 5'ATCCCAAAGAAGAAAGACAAA 3'		
Hatpase182	H <sup>+</sup> -ATPase tipo P	F 5'ACAATCTTCAAGAAGCCACT 3'	59,8	177
		R 5'GGTATCTAAAGAGCATAGCATC 3'		
Hatpase252	H <sup>+</sup> -ATPase tipo P	F 5'CTGTTTGTGAGTGGAAAGACTG 3'	57,5	112
		R 5'TTTGTTGAAGATGTGATTGTC 3'		
Hatpase272	H <sup>+</sup> -ATPase tipo P	F 5'GGGTTGTCCGAACAATCAC 3'	59,8	152
		R 5'GCACAATCTCAAAGCATTGG 3'		

Nesta mesma tabela, também são mostrados os 6 genes constitutivos (*EF-1 $\alpha$ 1*, *EF-1 $\alpha$ 2*, *EF-1 $\alpha$ 3*, *EF1 $\beta$* , *F-box* e *IDE*) que foram testados para serem usados como genes de referência para verificação da expressão relativa dos genes de interesse através de PCR em tempo real.

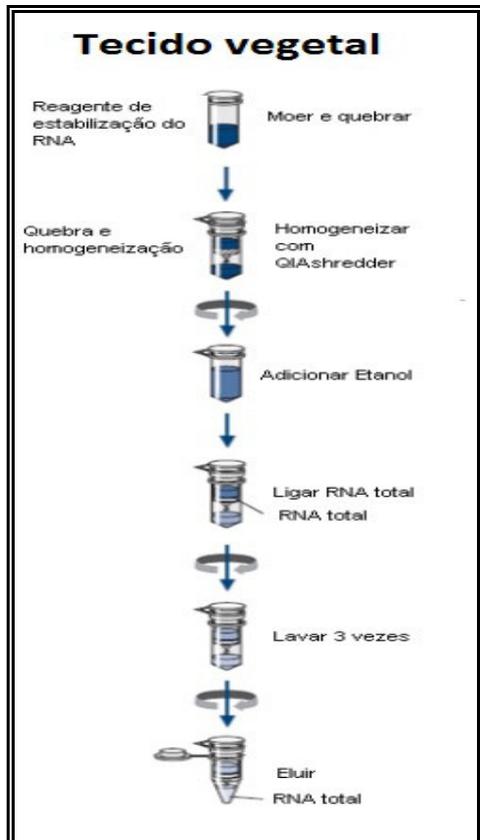
#### 4.11 Extração do RNA total

As sementes foram semeadas em areia grossa e 96 horas após a semeadura, as plântulas foram cuidadosamente retiradas dos vasos, com o auxílio de água corrente para a remoção do substrato e transferidas para a hidroponia em solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON (1950) a 1/4 de força por 72 horas. Ao término deste tempo, a solução foi substituída por solução nutritiva (HOAGLAND & ARNON (1950)) modificada a 1/2 de força por mais 72 horas. Em seguida, as plantas foram colocadas em soluções nutritivas 1/2 de força, em ausência e presença de NaCl (0 mM e 100 mM).

O RNA total foi extraído de raízes e folhas de *Vigna unguiculata* cv. Pitiúba e Setentão, em condições controle e 100 mM de NaCl nos tempos: 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a aplicação do tratamento e imediatamente armazenado em N<sub>2</sub> líquido.

Para extração de RNA total, 200 mg do material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido, utilizando-se almofariz e pistilo. Após o material ser colocado nos eppendorfs, foi congelado no N<sub>2</sub> líquido e armazenado no freezer na temperatura -80 °C vegetal macerado obtido, fez-se a extração de RNA total, através do *RNeasy plant mini Kit* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Às amostras maceradas foram adicionados 700  $\mu$ L do tampão RLT (designação do fabricante do kit) e 10  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol, homogeneizadas usando-se o vórtex, e a solução obtida foi transferida através de pipetagem para uma mini coluna do kit (QIAshedder Spin column-lilás, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e centrifugada a 25 °C por 2 minutos a 18.840 g. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo tubo eppendorf, sendo adicionado etanol 95% (400  $\mu$ l) e a solução obtida foi misturada por inversão. A solução obtida anteriormente (em torno de 700  $\mu$ L) foi transferida para uma nova coluna do kit (RNeasy mini spin column – rosa, acoplada a um tubo coletor de 2 ml) e centrifugada a temperatura ambiente (25 °C) por 15 segundos a 9.610 g. O eluído foi descartado sendo adicionado na coluna rosa 350  $\mu$ L de tampão RW1 (designação do fabricante do kit), centrifugando-se a temperatura ambiente por 15 segundos a 9.610 g. Foram aplicados

80  $\mu\text{L}$  de desoxirribonucleases (DNase) na coluna, sendo esta deixada a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcorrido este tempo, adicionou-se novamente 350  $\mu\text{L}$  de RW1 e fez-se nova centrifugação a temperatura ambiente por 15 segundos a 9.610 g. Após a última lavagem com RW1 a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de RPE na coluna, que foi submetida a uma centrifugação a temperatura ambiente por 15 segundos a 9.610 g. O eluído foi descartado e foram adicionados mais 500  $\mu\text{L}$  de RPE (designação do fabricante do kit) na coluna, submetendo-a a uma nova centrifugação a temperatura ambiente por 2 minutos a 9.610 g, a fim de eliminar qualquer resíduo de etanol que possa interferir em reações posteriores. O eluído e o tubo coletor foram descartados e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 1,5 mL. Em sequência foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de água livre de RNases diretamente na coluna, submetendo a nova centrifugação por 1 min. a 9.610 g para eluição do RNA. O RNA eluído foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior quantificação, análises eletroforéticas, reações de transcrição reversa (TR) e ensaios de RT-qPCR. Os passos de extração do RNA total usando-se o *RNeasy plant mini Kit* estão resumidos na figura 4.



**Figura 4.** Etapas da extração de RNA total.

#### 4.12 Testes de Quantificação, pureza e integridade do RNA total

Após extração do RNA total a concentração e pureza das amostras foram determinadas através do espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) em comprimentos de onda de 260nm. Para estimar a pureza do RNA extraído, a razão de 260/280 nm de absorbância foi utilizada para identificar contaminações por proteínas (razão deve estar entre 1,8 a 2) e a razão de 260/230 nm de absorbância utilizada para contaminações por polissacarídeos (razão deve estar acima de 2).

Com a quantificação realizada e de posse de dados que indicaram um grau de pureza ideal, foram realizados os ensaios para aferir a integridade do RNA total, já que este poderia estar contaminado com DNA genômico ou ter sua integridade comprometida. Para isso, foram realizadas eletroforeses em géis de agarose a 1%. A agarose (ainda líquida) foi colocada em uma bandeja apropriada para inserção de pentes, o que possibilita a formação de canaletas (poços). O gel de agarose foi colocado em uma cuba eletroforética, e esta foi preenchida com tampão MOPs (ácido 3-(n-morfolino) propanosulfônico) 20 mM e ligada a um gerador que polariza a cuba com amperagem constante de 35 mA.

Em cada canaleta foi aplicado um volume específico para cada amostra (0,5 µg de RNA total), volume este determinado de acordo com a concentração do RNA total extraído, 1,5 µL do tampão da amostra (Azul de bromo fenol), sendo um volume final de 5 µL completado com água DEPC (água livre de RNases). Após solidificação, A corrida eletroforética durou aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Devido ao RNA possuir carga elétrica negativa em pH neutro, esta molécula migra entre os poros do gel em direção ao polo positivo da cuba, o que permite a formação de bandas separadas de acordo com o tamanho molecular do RNA. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) durante 10 minutos. O brometo de etídeo é um agente intercalante de RNA/DNA, que permite a visualização das bandas de DNA/RNA, quando exposto à luz ultravioleta. Para visualização do RNA ribossomal (18S e 28S) no gel de agarose, foi utilizado o transiluminador de luz UV, sendo o RNA fotodocumentado por meio do sistema Mini BIS Pro (Bio-Imaging Systems) com auxílio do software GEICapture™.

#### 4.13 Quantificação das amostras de RNA total e dos *primers*

Inicialmente o RNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), como descrito anteriormente. A quantificação foi realizada em triplicata, sendo feita uma média destas leituras. Este procedimento foi adotado a fim de evitar possíveis erros de quantificação que poderiam levar a resultados não confiáveis. Posteriormente, foi realizada uma corrida eletroforética visando identificar se as amostras de RNA estavam realmente homogêneas. Após essas análises as amostras de RNA estavam prontas para as reações de transcrição reversa.

Em relação aos *primers*, estes foram inicialmente diluídos para uma concentração de 500  $\mu\text{M}$ , sendo posteriormente, quantificados em triplicata usando-se o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Da média das concentrações obtidas das leituras foi calculada a concentração real de cada *primer*, sendo estes, posteriormente diluídos para uma concentração de 6  $\mu\text{M}$ , para se obter uma concentração final de 300 nM/ $\mu\text{L}$ , concentração que foi utilizada nas reações de qPCR.

#### 4.14 Determinação da temperatura ótima de anelamento dos *primers*

A fim de determinar a temperatura ótima para o anelamento de cada par de primer foi feito um gradiente de temperatura usando um *pool* das amostras de cDNA. O procedimento foi realizado em termociclador Mastercycler ep realplex 4S (Eppendorf®). As temperaturas usadas foram (50,5; 52,7; 55; 57,5; 59,8; 61,9 e 65°C). Foram selecionadas as temperaturas de menor Ct e com as curvas mais típicas (sigmóides). As temperaturas selecionadas para cada par de *primers* variaram. A tabela 2 mostra as temperaturas de anelamento dos *primers* selecionadas para realização dos ensaios de qRT-PCR.

#### 4.15 Reações de transcrição reversa

Após as análises de pureza e integridade descritas anteriormente, o RNA total foi utilizado para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizando o Kit da IMpromII™ Transcriptase Reversa (Promega, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante. Nas reações foram adicionados aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  de RNA total, oligodT<sub>24</sub>, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, dNTPs 10 mM, tampão de reação 5X e água livre

de RNase (Qiagen). A tabela 3 mostra os reagentes utilizados para esta reação, bem como os seus respectivos volumes. A solução obtida após a adição dos reagentes supracitados (19  $\mu$ l) foi submetida a 65°C por 5 min. para desnaturação e, posteriormente, transferidos para o gelo. Logo após, 1  $\mu$ L da enzima transcriptase reversa foi adicionada em cada tubo de reação, completando o volume para 20  $\mu$ L. A reação de síntese da fita complementar ocorreu a 42°C por 1 hora, seguida de 75°C por 15 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C para posteriores reações de qPCR.

**Tabela 3.** Componentes e volumes usados nas reações de transcrição reversa.

<b>Reagentes</b>	<b>Volumes</b>
<b>RNA total (1<math>\mu</math>g)</b>	<b>Variável em função da concentração do RNA total</b>
<b>Tampão 5X</b>	<b>4,0 <math>\mu</math>L</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</b>	<b>2,4 <math>\mu</math>L</b>
<b>dNTPs (10 mM)</b>	<b>1,0 <math>\mu</math>L</b>
<b>OligodT24 (20 <math>\mu</math>mol/ <math>\mu</math>L)</b>	<b>3,0 <math>\mu</math>L</b>
<b>H<sub>2</sub>O livre de RNase</b>	<b>Variável em razão do volume de RNA total</b>
<b>Transcriptase reversa (160 <math>\mu</math>/<math>\mu</math>L)</b>	<b>1,0 <math>\mu</math>L</b>

#### **4.16 Teste da qualidade do cDNA por PCR semi-quantitativa**

A reação de PCR semi-quantitativa foi realizada para testar a qualidade do cDNA, produzido como descrito anteriormente. Utilizou-se para tal procedimento o par de *primers* referente ao gene *EF1a1*. Para cada reação foi utilizado 1  $\mu$ L de cDNA, acrescido de tampão de reação 5x, 1  $\mu$ L de dNTPs (5 mM), 1  $\mu$ L de cada iniciador específico (*primers*), 0,1  $\mu$ L da enzima Go Taq DNA polimerase. O volume total foi completado com água livre de RNase, totalizando 25  $\mu$ L. O resultado da amplificação foi visualizado em gel de agarose a 2%.

#### **4.17 Reações de qPCR**

As reações de amplificação por PCR quantitativa foram realizadas a partir do cDNA obtido das reações de transcrição reversa das amostras de RNA e diluídos para uma concentração de 25 ng/ $\mu$ L. A diluição das amostras de cDNA foi feita

considerando-se a concentração de 1000 ng/ $\mu$ L. Nas reações de qPCR foram utilizados 4  $\mu$ L de cDNA para cada reação, totalizando 100 ng/ $\mu$ L por poço. Aliquotas da mesma amostra de cDNA foram utilizadas para todas as reações gene-específicas. A qPCR foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: para cada reação (poço da placa) foram adicionados 10  $\mu$ L do Power SYBR Green PCR Master Mix 2X (*Applied Biosystems*), 4  $\mu$ L de cDNA (100 ng), 1  $\mu$ L de cada oligonucleotídeo iniciador (senso e antisenso), em uma concentração de 300 ng/ $\mu$ L e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada e livre de nucleases, totalizando 20  $\mu$ L de reação. O monitoramento em tempo real da PCR foi realizado em um termociclador Mastercycler ep realplex 4S (Eppendorf®) através da detecção dos níveis de fluorescência do SYBR Green usando o *Realplex Software*. As reações ocorreram em placas com 96 poços e foram realizadas em triplicata e conduzidas de acordo com os seguintes parâmetros: 1) 95 °C por 10 minutos; 2) 40 ciclos: 15 segundos de desnaturação a 95 °C, 15 segundos de anelamento, variando a temperatura de acordo com cada par de primer (Tabela 2), e 20 segundos de extensão a 60 °C. Também foi realizada a curva de dissociação (Melting), que consistiu de 15 segundos de incubação a 95 °C, 15 segundos de incubação a 60 °C e uma subida de 95 °C.

#### **4.18 Análise dos dados de expressão por RT-qPCR**

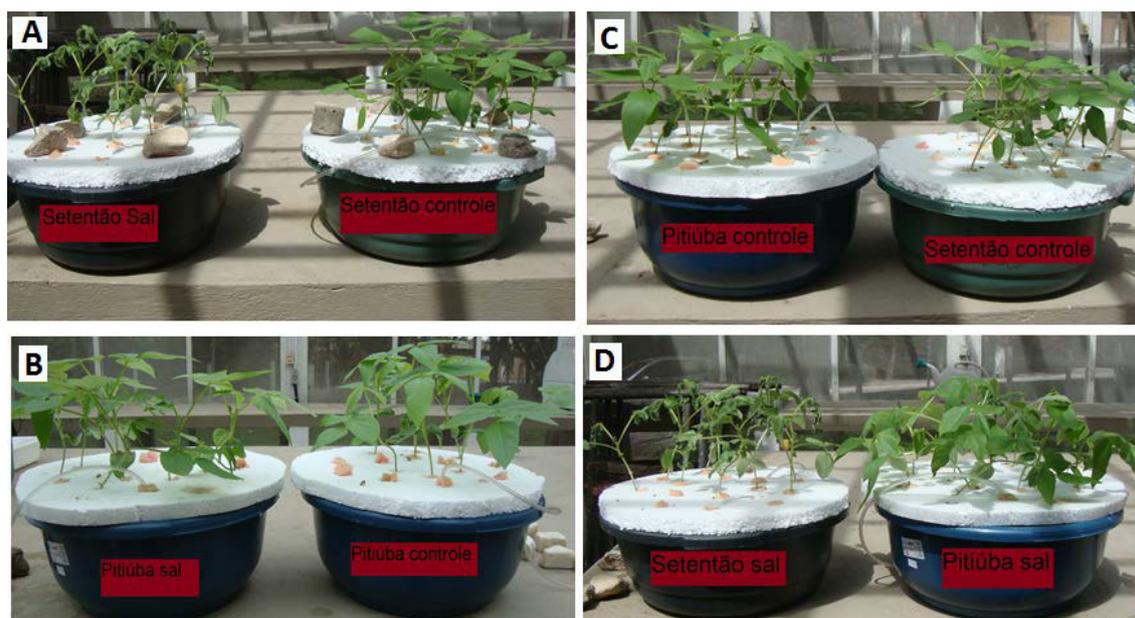
Após a realização das reações de PCR em tempo real, os níveis de expressão gênica foram determinados pelo número de ciclos de amplificação necessários para a fluorescência (emitida pelo SYBR Green) ultrapassar um limiar durante a fase exponencial da reação de PCR, determinado pelo Ct (*Cycle threshold*). Os Cts utilizados para as análises foram obtidos através da média aritmética entre as triplicatas de reações para cada condição e gene. Para normalização dos resultados, foi utilizada a equação  $\Delta Ct = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (\text{controle endógeno})$ . Os valores brutos de Ct foram convertidos em dados de expressão relativa utilizando-se o método delta Ct e delta-delta Ct (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) com o auxílio do programa GeNorm (VAMDESOMPELE *et al.*, 2002).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Estudos Fisiológicos e Bioquímicos

#### 5.1.1 Resposta visual dos cultivares Pitiúba e Setentão de *Vigna unguiculata* à aplicação de 100 mM de NaCl na solução hidropônica.

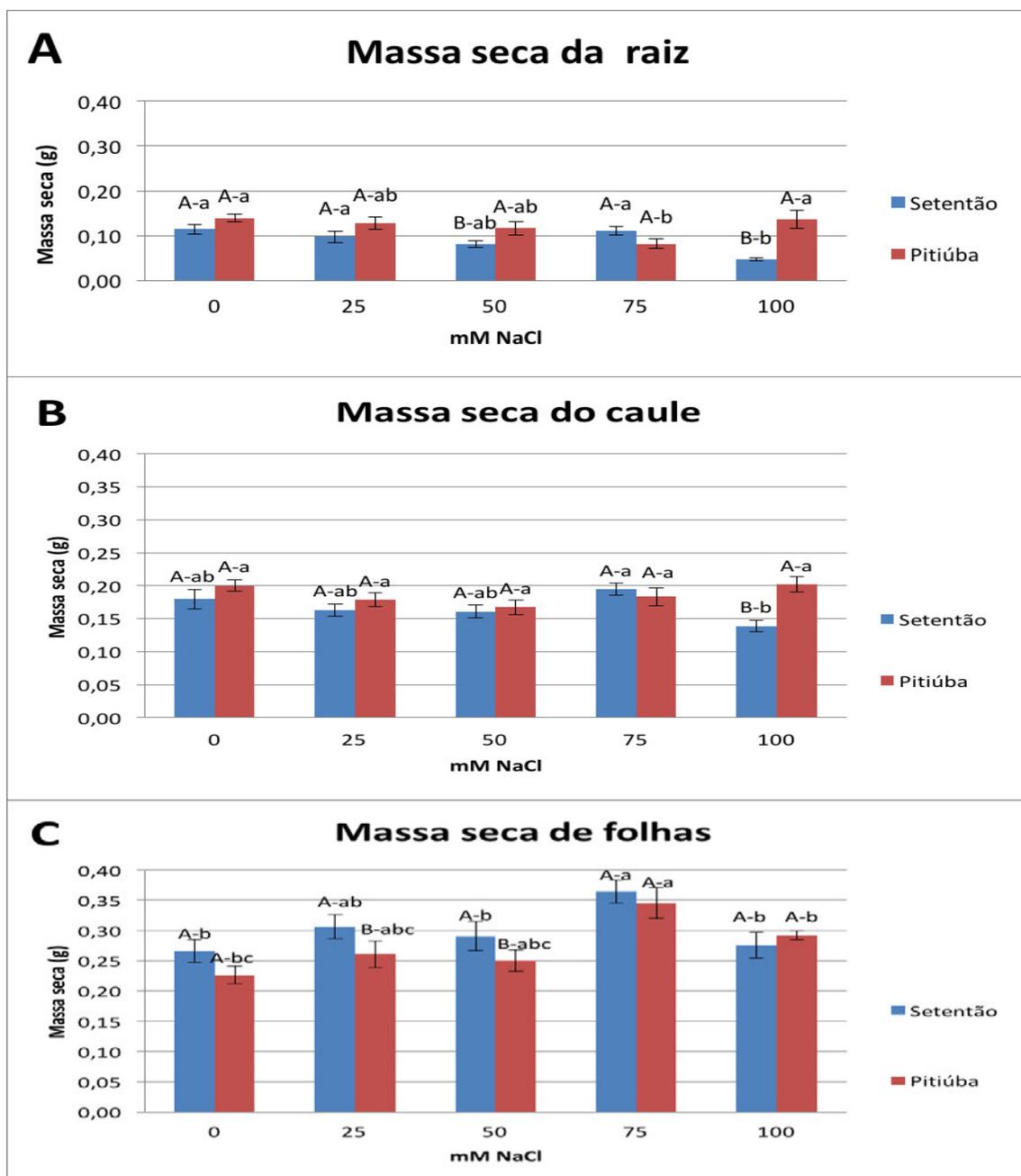
Os cultivares Pitiúba e Setentão de *Vigna unguiculata* foram fotografados após 10 dias de germinação e 6 horas de submissão ao estresse salino (NaCl 100 mM) (Figura 5 D). Os dois cultivares apresentaram comportamento diferenciado em relação ao estresse salino revelando visualmente perda de turgor apenas no cultivar Setentão (Figura 5 A, B, C e D). Deve-se salientar que alguma perda de turgor no cultivar Pitiúba foi observada principalmente nas primeiras 3 horas de aplicação do estresse (dados não mostrados).



**Figura 5.** Plantas de *Vigna unguiculata*, cultivares Setentão e Pitiúba, cultivadas em solução hidropônica, sob condições controle e 100 mM de NaCl (sal), decorridos 10 dias da sementeira e com 6 horas após a adição de NaCl. A) Setentão a 100 mM de NaCl e controle. B) Pitiúba a 100 mM de NaCl e controle. C) Pitiúba e Setentão controle. D) Pitiúba e Setentão a 100 mM de NaCl

#### 5.1.2 Massa seca dos diferentes órgãos

A figura 6A mostra o efeito de diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl na massa seca de raízes em ambas os cultivares.



**Figura 6.** Massa seca das raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas de *Vigna unguiculata*, cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias, decorridos 10 dias da semeadura. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os dois cultivares. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações de NaCl, dentro de um mesmo cultivar. Tratamentos com letras iguais não são estatisticamente diferentes entre si, de acordo com o teste de Turkey ( $P \leq 0,05$ ).

O cultivar Setentão foi o que apresentou maior inibição (63,24%) deste parâmetro observado na concentração de 100mM de NaCl em relação ao controle. A maior inibição no cultivar Pitiúba foi observada na concentração de 75 mM (42,5 %) em relação ao controle. Na figura 6B observa-se que nenhuma das concentrações de NaCl causou alterações estatisticamente significativas na massa seca dos caules do cv. Pitiúba, ao passo que no cv. Setentão apenas a concentração de 100 mM de NaCl causou inibição de 22,85%. Isto indica que a massa seca de caules foi mais afetada pelo NaCl no cv. Setentão sem causar efeito inibitório no cv. Pitiúba.

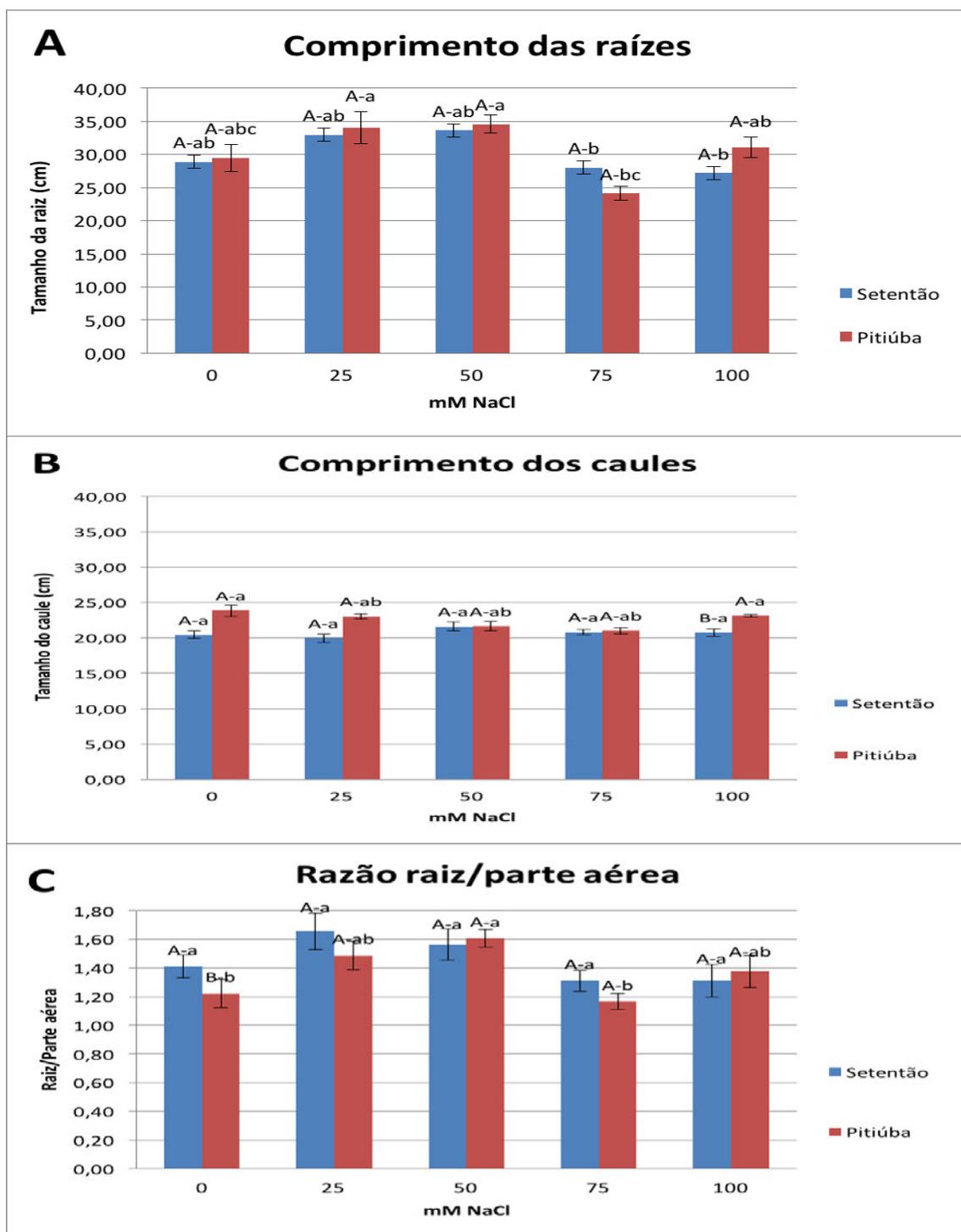
A figura 6C ilustra o efeito das diferentes concentrações do NaCl na massa seca das folhas de *Vigna unguiculata*, Pitiúba e Setentão. A concentração de 75 mM de NaCl aumentou a massa seca de folhas em relação a condição controle nos cultivares Setentão e Pitiúba, já nas demais concentrações de NaCl não ocorreram diferenças estatisticamente significantes entre os dois cultivares.

### **5.1.3 Comprimento de raízes, caules e razão Raiz/Parte aérea de plantas de *Vigna unguiculata* submetidas a diferentes concentrações de NaCl**

A figura 7A mostra o efeito de diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl sobre o crescimento das raízes de *Vigna unguiculata* Pitiúba e Setentão. Pode-se observar nesta figura que nos cvs. Pitiúba e Setentão a concentração de 100 mM de NaCl não causou inibição do crescimento radicular em relação ao controle.

Em relação ao caule, observou-se que o cultivar Pitiúba apresenta caules mais compridos independentemente da concentração de NaCl aplicado em relação a Setentão e que para ambas os cultivares a aplicação das diferentes concentrações de NaCl não causou diferenças estatísticas no comprimento dos caules (Figura 7B).

As razões Raiz/Parte aérea (R/PA) para os dois cultivares de *Vigna unguiculata* (L) Walp são mostradas na figura 7C. Como mostrado anteriormente as diferentes concentrações de NaCl causaram pouca ou nenhuma interferência com o crescimento de raízes e caules, neste sentido, pode-se observar o mesmo comportamento para as relações R/PA em ambos os cultivares (Figura 7C). Na concentração 25 mM de NaCl, Setentão apresentou as maiores relações R/PA, isto foi devido aos maiores tamanhos de raízes desta cultivar em relação a Pitiúba, que por sua vez também apresenta caules ligeiramente mais compridos que os de Setentão.



**Figura 7.** Comprimento das raízes (A), caules (B) e razão raiz/parte aérea (C) de plantas de *Vigna unguiculata*, cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75, e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias, decorridos 10 dias da sementeira. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os dois cultivares. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações de NaCl, dentro de um mesmo cultivar. Tratamentos com letras iguais não são estatisticamente diferentes entre si, de acordo com o teste de Turkey ( $P \leq 0,05$ ).

Pela análise destes dados não há muitas diferenças em relação a influência das diferentes concentrações de NaCl no comprimento de raízes e caules para ambos os cultivares.

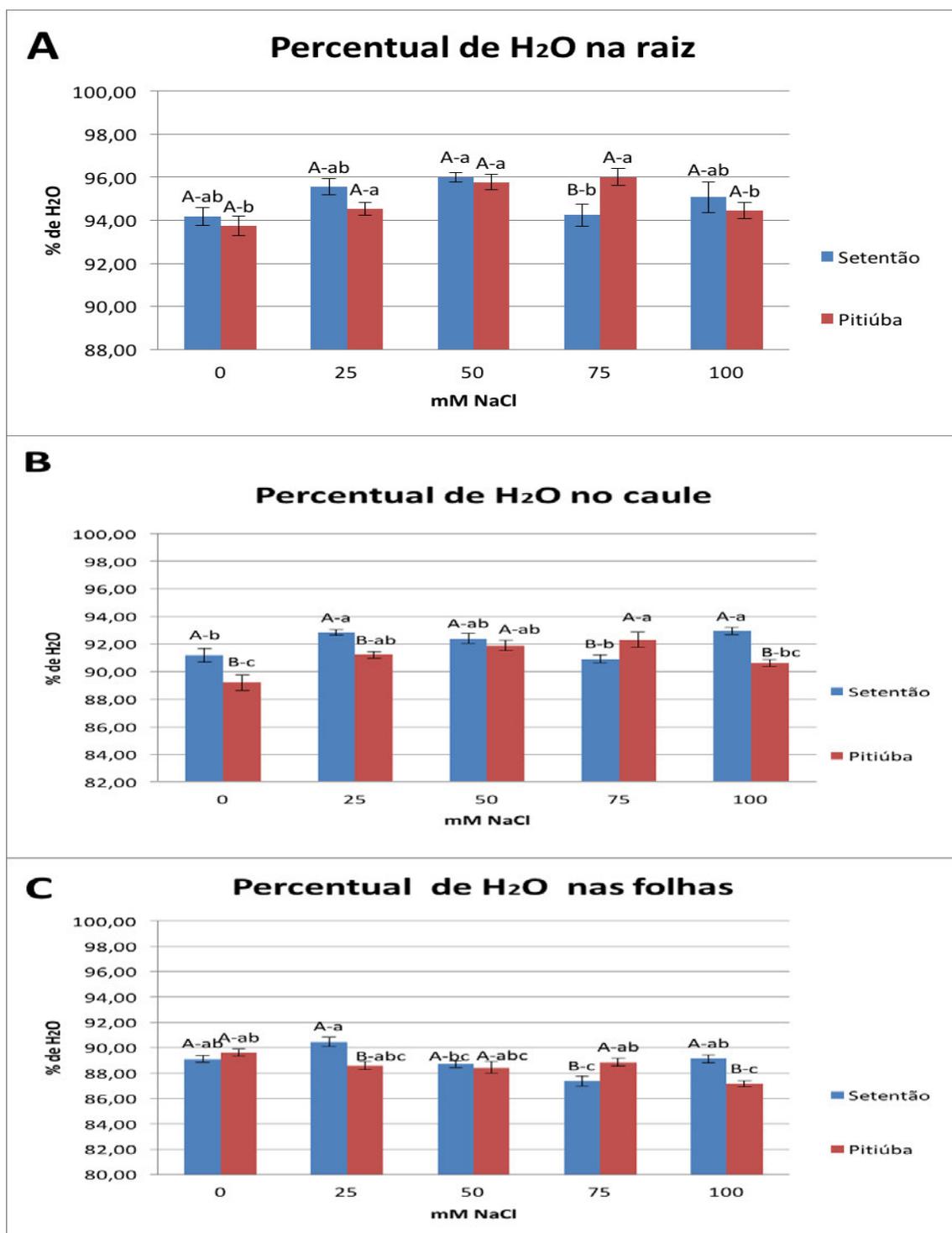
#### **5.1.4 Percentual de água em raízes, caules e folhas de plantas de *Vigna unguiculata* submetidas a diferentes concentrações de NaCl**

As figuras 8A, 8B e 8C mostram as variações na quantidade de água (%) encontradas em raízes, caules e folhas, respectivamente, de Pitiúba e Setentão quando submetidos a diferentes concentrações de NaCl.

Nas raízes (Figura 8A), não foram observadas variações significativas no percentual de água para os dois cultivares.

Nos caules (Figura 8B), Setentão mesmo na condição controle já apresentava um percentual de água superior ao de Setentão (91,18% Setentão e 89,21 Pitiúba %), isto foi também observado na presença de 100 mM de NaCl, condição na qual o cultivar Setentão manteve mais água no caule (92,95%) em relação a Pitiúba (90,62%).

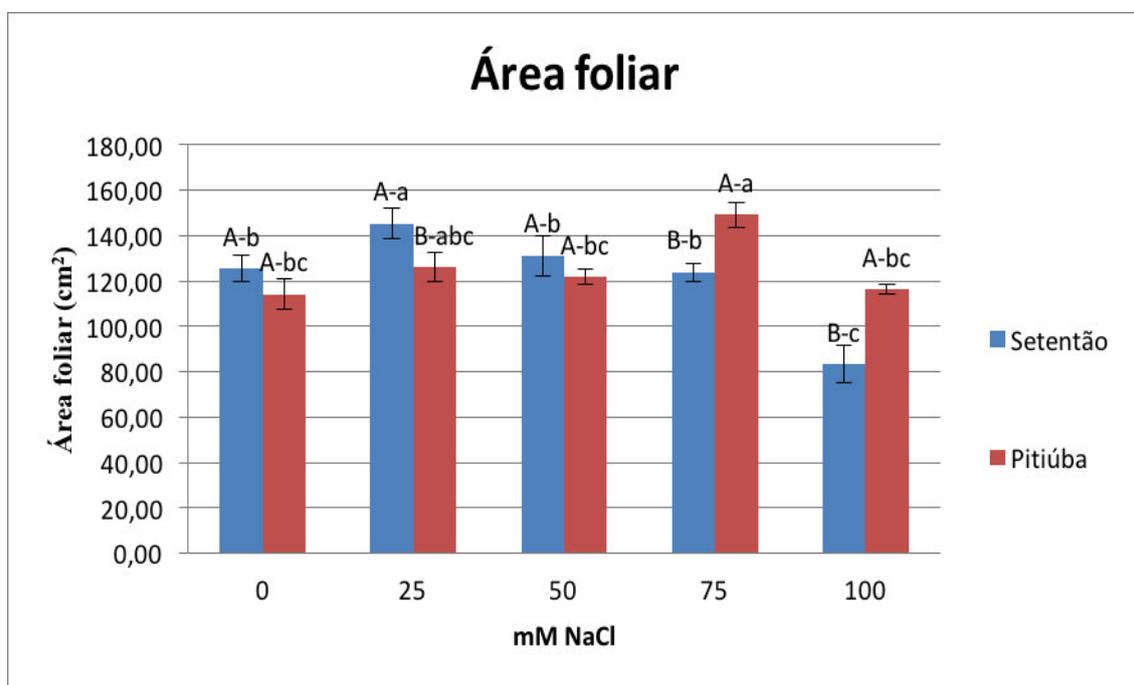
Nas folhas (Figura 8C) é nitida a diferença entre os dois cultivares, visto que Setentão apresentou 89,13% de água e Pitiúba 87,17% na presença de 100 mM de NaCl. O maior percentual de água nas folhas (90,47%) foi observado em Setentão quando submetido a 25 mM de NaCl.



**Figura 8.** Percentual de água em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas de *Vigna unguiculata*, cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias, decorridos 10 dias da sementeira. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os dois cultivares. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações de NaCl, dentro de um mesmo cultivar. Tratamentos com letras iguais não são estatisticamente diferentes entre si, de acordo com o teste de Turkey ( $P \leq 0,05$ ).

### 5.1.5 Efeito de diferentes concentrações de NaCl na área foliar em plantas de *Vigna unguiculata*

A figura 8 mostra os efeitos das diferentes concentrações de NaCl sobre o parâmetro área foliar. Nesta figura pode-se observar que o cv. Pitiúba apresentou a maior área foliar (149,31 cm<sup>2</sup>) na presença de 75 mM de NaCl, assim como na presença de 100 mM de NaCl, concentrações nas quais observou-se áreas foliares de 116,32 cm<sup>2</sup> e 123,38 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Por outro lado, Setentão apresentou a menor área foliar revelando valores de 83,36 cm<sup>2</sup> submetido a 100 mM de NaCl.



**Figura 9.** Área foliar de plantas de *Vigna unguiculata*, cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias, decorridos 10 dias da sementeira. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os dois cultivares. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações de NaCl, dentro de um mesmo cultivar. Tratamentos com letras iguais não são estatisticamente diferentes entre si, de acordo com o teste de Turkey ( $P \leq 0,05$ ).

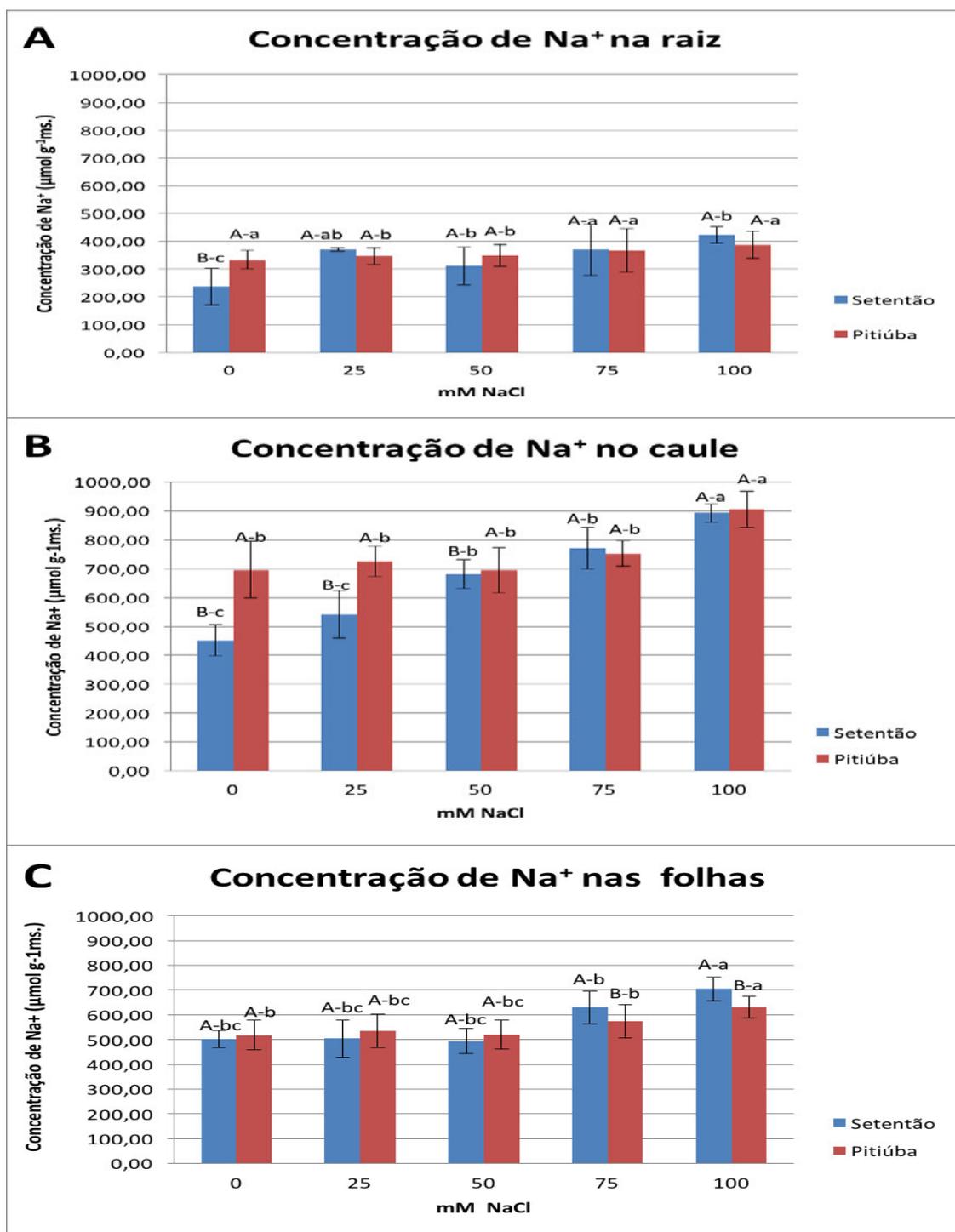
### 5.1.6 Concentrações de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> solúveis em raízes, caules e folhas de *Vigna unguiculata*

A quantidade de íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, foi analisada em raízes, caules e folhas (Figuras 10 (A, B e C) e 11 (A, B e C) respectivamente) dos dois cultivares de *Vigna unguiculata* (Pitiúba e Setentão) submetidas a diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl.

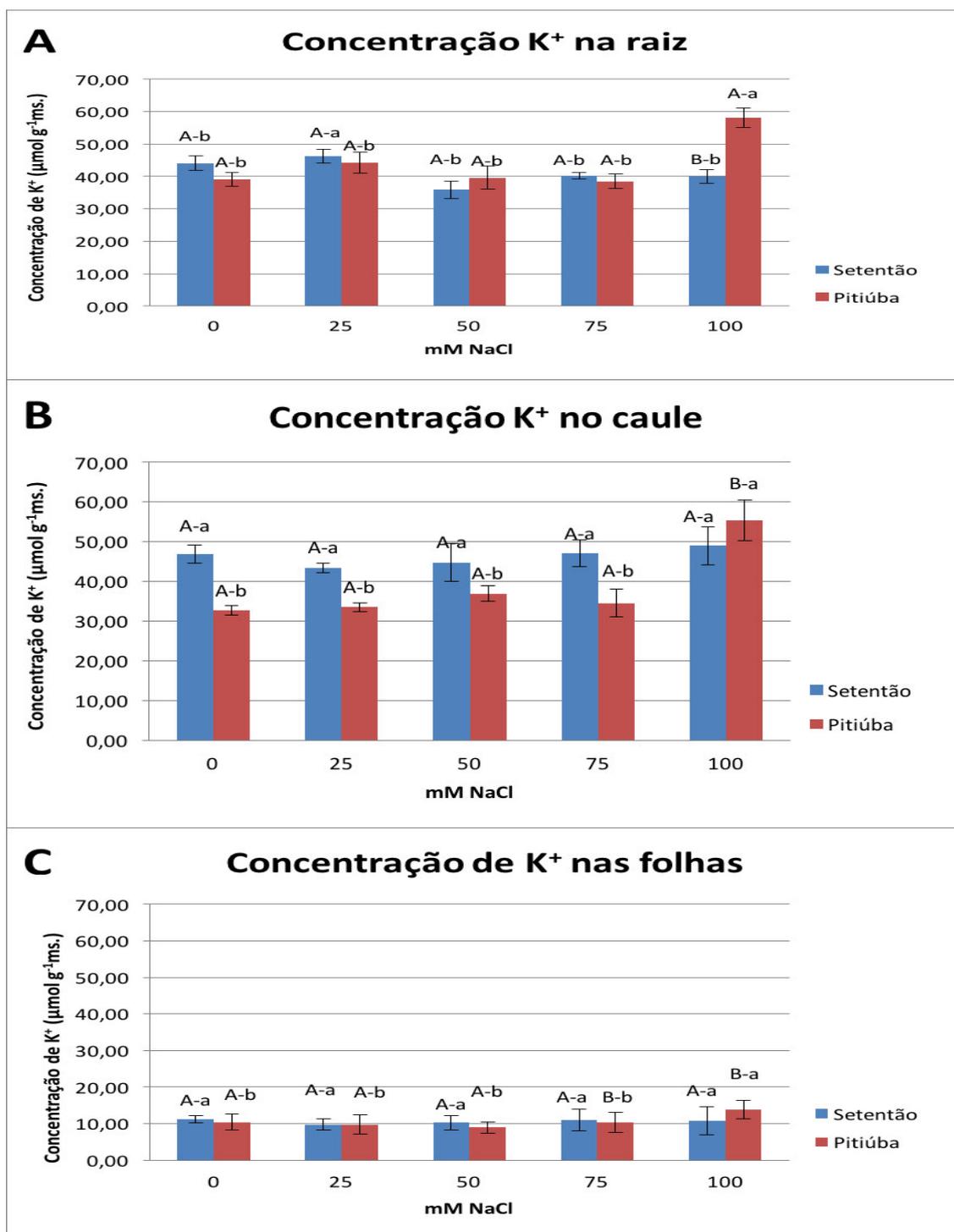
As análises da concentração de Na<sup>+</sup> nas raízes (Figura 10A) revelou que em condições controle Setentão é 40,15% mais concentrado que Pitiúba, há diferenças estatisticamente significativas para ambos os cultivares. A exposição as diferentes concentrações do NaCl levaram ao aumento na concentração do Na<sup>+</sup> em Setentão, sendo o maior aumento na concentração (78,09%) em 100 mM do sal. Em Pitiúba a aplicação do NaCl nas concentrações 25 e 50 mM não levou a aumentos significativos na concentração deste íon, mas a aplicação de 100 mM, levou ao aumento de 16,75% na concentração do Na<sup>+</sup>.

A análise dos caules revelou que, Pitiúba no controle apresentou um aumento na concentração de Na<sup>+</sup> (54,03%) em relação a Setentão. No tratamento 100 mM de NaCl Setentão aumentou a concentração do sal em 97,43% e Pitiúba também aumentou, porém, apenas 30,16%, quando ambos os cultivares são comparados a seus respectivos controles.

Nas folhas de Setentão não se observou nos tratamentos 25 e 50 mM aumentos expressivos na concentração do sal, a partir de 75 e 100 mM ocorreram aumentos de 25,71% e 40,46% respectivamente. Para o cultivar Pitiúba a condição controle apresentou concentrações semelhantes as de Setentão, porém, os aumentos na concentração do Na<sup>+</sup> em 75 e 100 mM também mostraram aumentos, de 10,63% e 21,64% respectivamente.



**Figura 10.** Concentrações de Na<sup>+</sup> solúvel (µmols g<sup>-1</sup>ms.) em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas de *Vigna unguiculata*, cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias, decorridos 10 dias da sementeira. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os dois cultivares. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações de NaCl, dentro de um mesmo cultivar. Tratamentos com letras iguais não são estatisticamente diferentes entre si, de acordo com o teste de Turkey (P≤0,05).



**Figura 11.** Concentrações de K<sup>+</sup> solúvel (µmols g<sup>-1</sup>ms.) em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas de *Vigna unguiculata*, cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias, decorridos 10 dias da semeadura. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os dois cultivares. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações de NaCl, dentro de um mesmo cultivar. Tratamentos com letras iguais não são estatisticamente diferentes entre si, de acordo com o teste de Turkey ( $P \leq 0,05$ ).

Em relação a concentração dos íons  $K^+$  nas raízes (Figura 11A), observou-se que em Setentão o aumento na exposição ao NaCl até 100 mM reduziu a concentração de  $K^+$  em 40% comparativamente ao controle. Entretanto, em Pitiúba, as diferentes concentrações de NaCl não causaram alterações estatisticamente significativas exceto 100 mM que causou um aumento na concentração do  $K^+$  (58,11%).

Nos caules (Figura 11B) de Pitiúba apenas o tratamento de 100 mM de NaCl causou um incremento de 69,61% na concentração de  $K^+$ , enquanto que, em Setentão, a aplicação de concentrações crescentes de NaCl (25, 50, 75 e 100 mM) não geram aumentos estatisticamente significantes na concentração do  $K^+$ .

Em folhas (Figura 11C), observou-se que apenas a condição de 100 mM de NaCl em Pitiúba, foi capaz de aumentar a concentração de  $K^+$ , revelando aumento de 32,82% em Pitiúba, quando comparados ao controle. Já em Setentão, a aplicação das diferentes concentrações de NaCl não gerou alteração estatisticamente significativas.

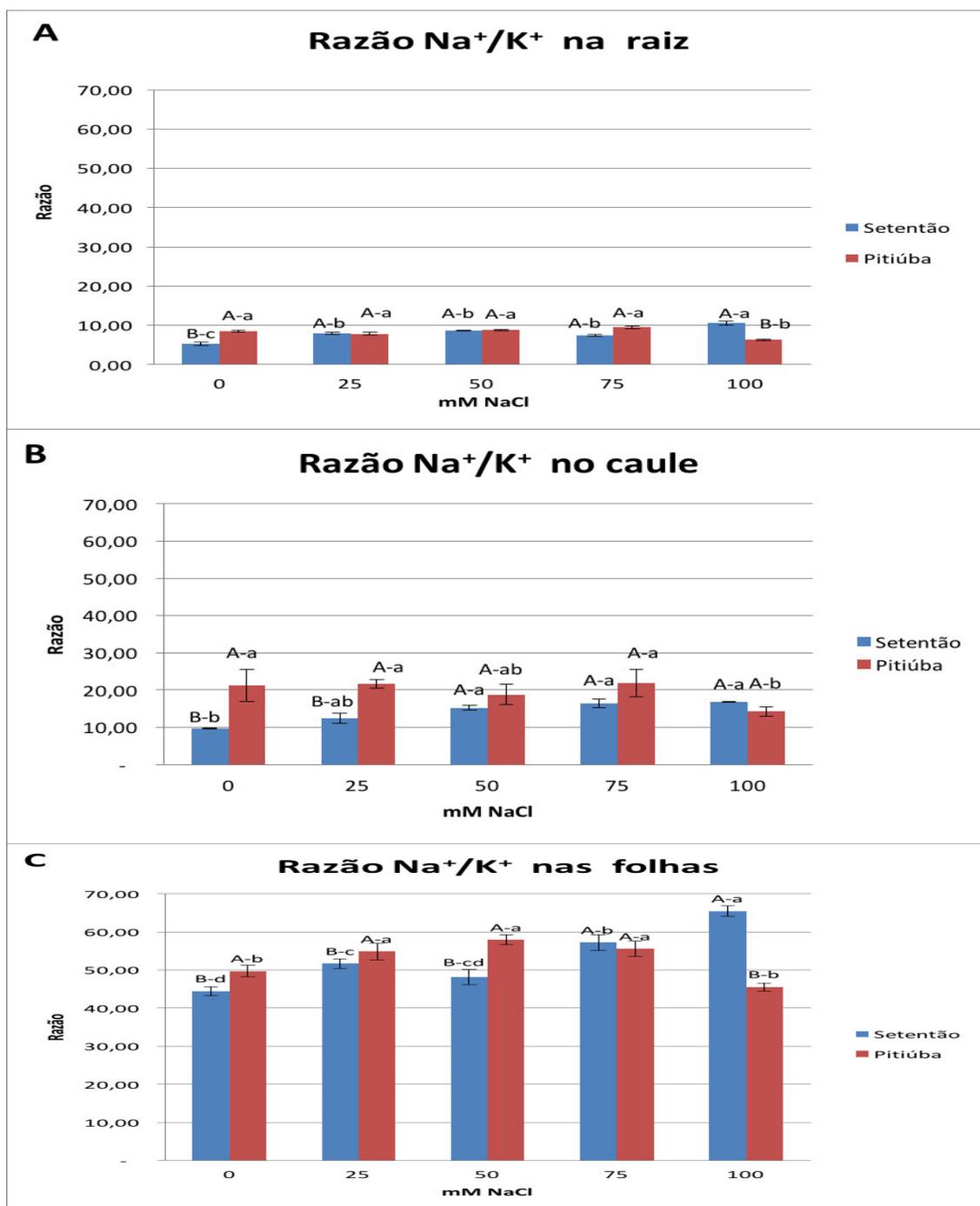
#### **5.1.6.1 Razão $Na^+/K^+$ em raízes, caules e folhas de *Vigna unguiculata***

O presente estudo mostrou as razões  $Na^+/K^+$  de raízes (Figura 12A), caules (Figura 12B) e folhas (Figura 12C) de plantas de *Vigna unguiculata*, cultivares Pitiúba e Setentão.

Em raízes, na concentração de 100 mM de NaCl observou-se um forte aumento da razão  $Na^+/K^+$  de 96,46% em Setentão e uma redução de 25,76% em Pitiúba.

Nos caules, também em 100 mM de NaCl, igualmente observou-se uma redução da razão  $Na^+/K^+$  de 32,97% em Pitiúba e um aumento em Setentão de 74,61%.

De maneira semelhante, em folhas, 100 mM de NaCl causou redução desta razão correspondendo a 8,4% em Pitiúba e aumento em Setentão de 47,24%.



**Figura 12.** Razão Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas de *Vigna unguiculata*, cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias, decorridos 10 dias da semeadura. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os dois cultivares. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações de NaCl, dentro de um mesmo cultivar. Tratamentos com letras iguais não são estatisticamente diferentes entre si, de acordo com o teste de Turkey (P≤0,05).

### **5.1.7 Concentração de prolina em raízes, caules e folhas de *Vigna unguiculata* submetidas a diferentes concentrações de NaCl**

As figuras 13A, B e C, respectivamente, mostram as concentrações de prolina ( $\mu\text{moles g}^{-1}\text{ms}$ ) em raízes, caules e folhas nos cultivares Pitiúba e Setentão.

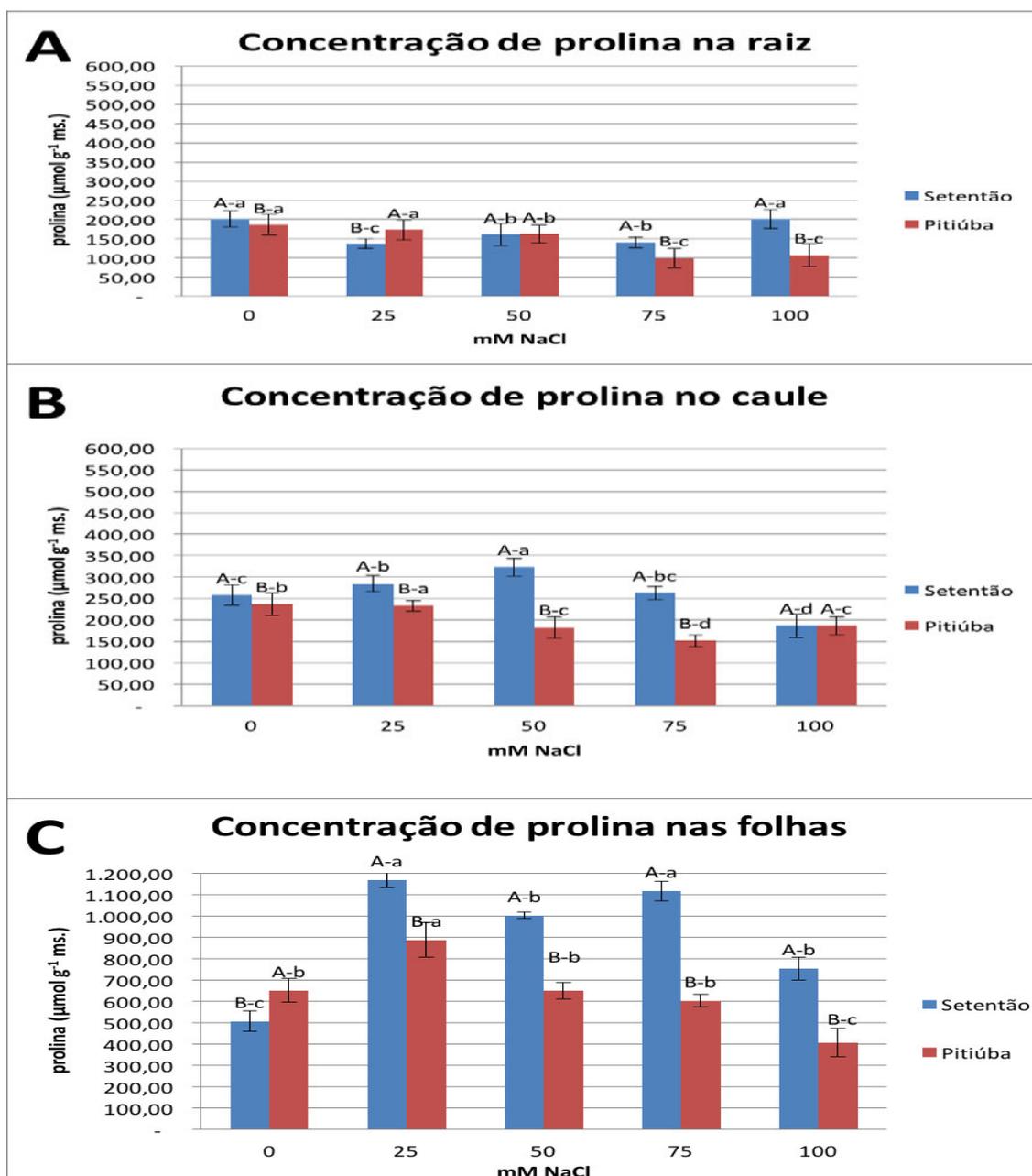
Nas raízes em 100 mM de NaCl Setentão teve um aumento de 9,67% contra uma redução de 44,18% em Pitiúba na concentração de prolina.

Nos caules o maior aumento em Setentão (25,01%) foi no tratamento 50 mM de NaCl, enquanto que, em Pitiúba o não houve aumento. 100 mM de NaCl causou redução na concentração de prolina os dois cultivares, em Setentão 27,6% e em Pitiúba 21,1%.

Nas folhas, notou-se que a concentração inicial de prolina em Pitiúba foi maior (28,54%) que a encontrada em Setentão. Em 100 mM de NaCl, ocorreu um aumento de 48,81% para Setentão e uma redução de 37,36% em Pitiúba, indicando claramente comportamentos distintos na síntese de prolina nos dois cultivares, quando submetidas ao estresse salino.

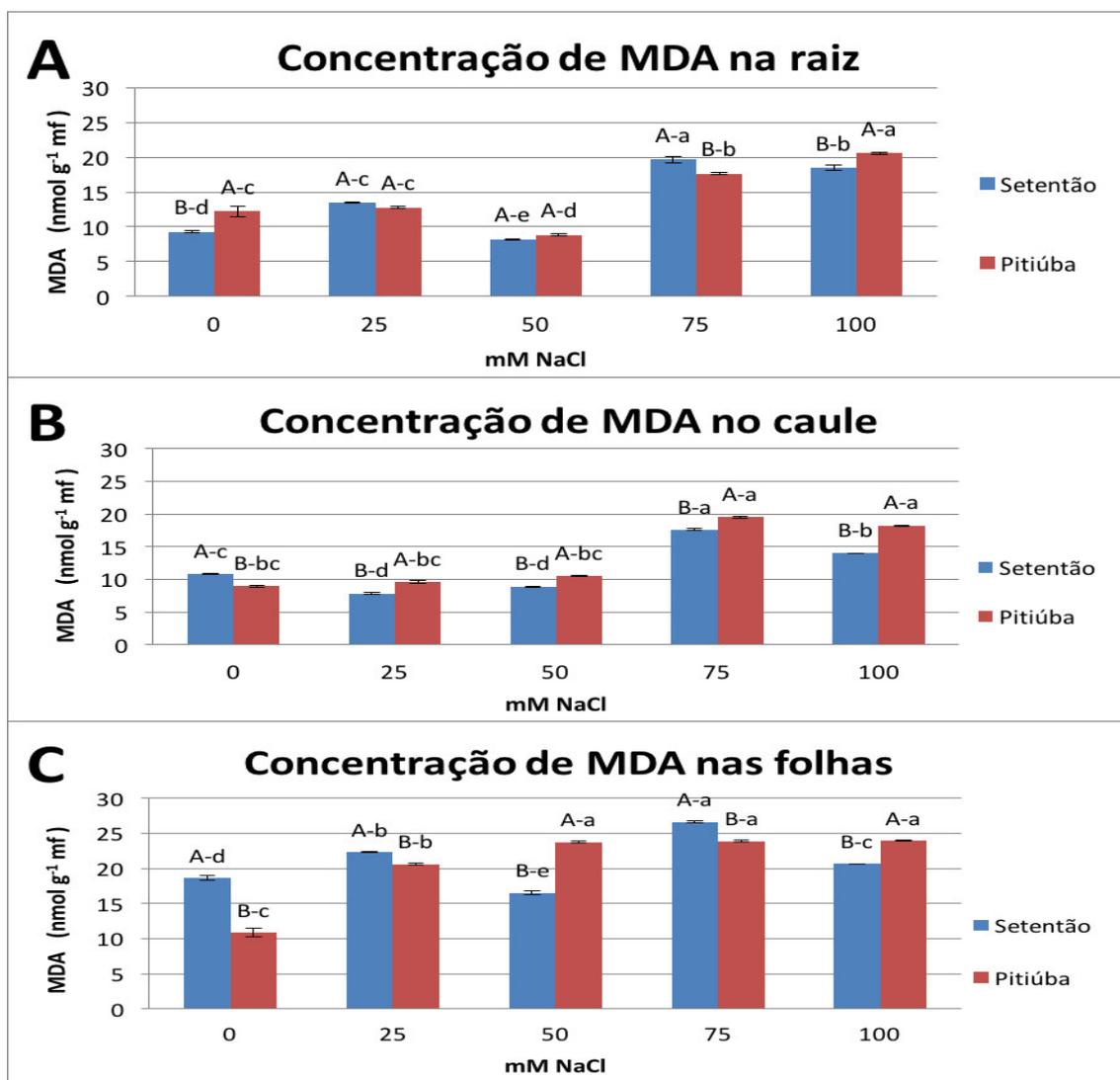
### **5.1.8 Concentração de Malondealdeido em raízes, caules e folhas de plantas de *Vigna unguiculata* submetidas a diferentes concentrações de NaCl**

As figuras 14A (raízes), 14B (caules) e 14C (folhas) ilustram as alterações nas concentrações de Malondealdeido (MDA) quando plantas de *Vigna unguiculata* cultivares Pitiúba e Setentão foram tratados com diferentes concentrações de (0, 25, 50, 75 e 100 mM) NaCl.



**Figura 13.** Concentração de prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ms.}$ ) em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas de *Vigna unguiculata*, cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias, decorridos 10 dias da sementeira. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os dois cultivares. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações de NaCl, dentro de um mesmo cultivar. Tratamentos com letras iguais não são estatisticamente diferentes entre si, de acordo com o teste de Turkey ( $P \leq 0,05$ ).

Em raízes expostas a 100 mM de NaCl observamos um aumento na concentração de MDA na ordem de 98,7% em Setentão, e 68,52%, em Pitiúba. Nos caules, o maior incremento na concentração de MDA ocorre na presença de 75 mM de NaCl, tanto para Setentão (62,56%) quanto para Pitiúba (118,7%). Em relação as folhas observou-se que na presença de 100 mM de NaCl houve um aumento na concentração de MDA de 10,91% em Setentão e de 110,16% em Pitiúba.



**Figura 14.** Concentração de Malondealdeído (nmol g<sup>-1</sup> mf.) em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas de *Vigna unguiculata*, cultivares Pitiúba e Setentão, sob diferentes concentrações (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl aplicadas por 5 dias, decorridos 10 dias da sementeira. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os dois cultivares. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as concentrações de NaCl, dentro de um mesmo cultivar. Tratamentos com letras iguais não são estatisticamente diferentes entre si, de acordo com o teste de Turkey (P≤0,05).

## 5.2 Estudos Moleculares

### 5.2.1 Quantificação e integridade dos RNAs isolados

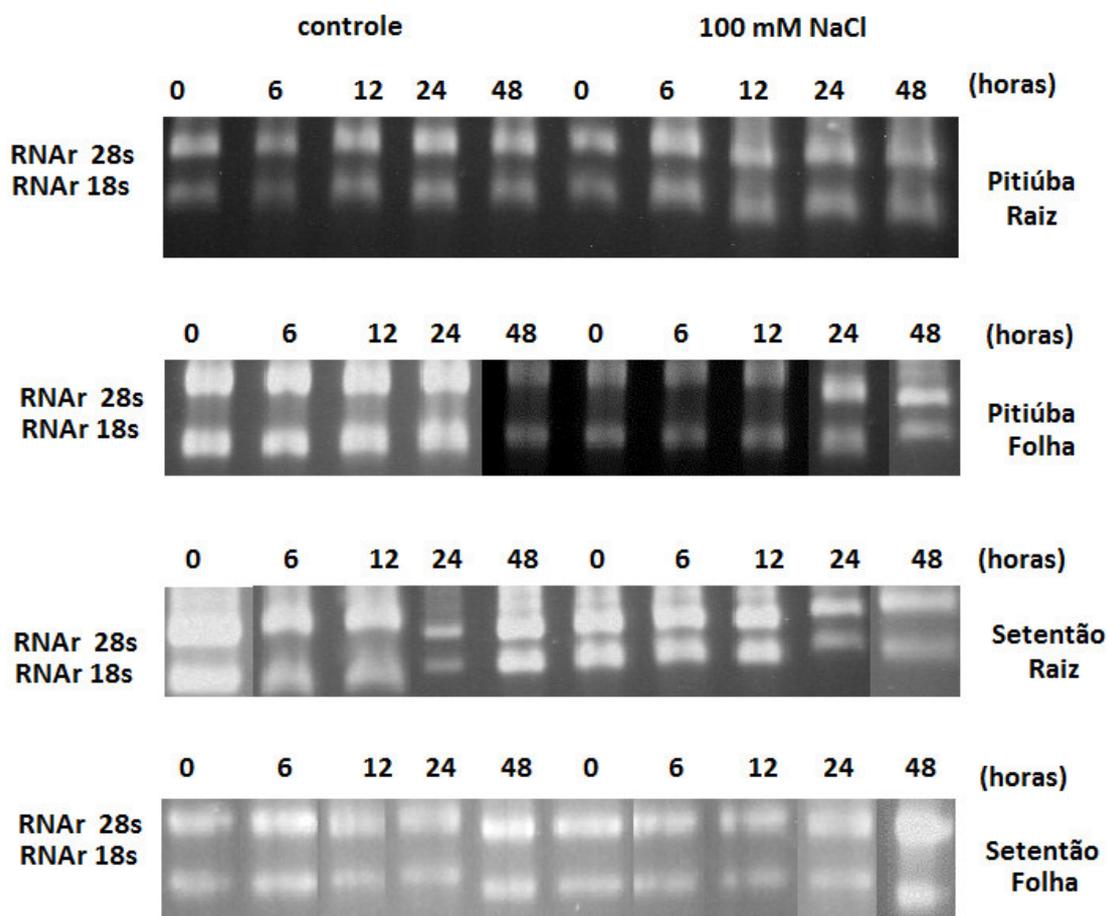
O RNA total foi extraído de raízes e folhas de *Vigna unguiculata* em condições controle e 100 mM de NaCl nos tempos: 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a aplicação do NaCl. A quantificação em espectrofotômetro NANODROP mostrou que as relações 260/280 e 260/230 ficaram entre 1,96/2,18 e 1,59/1,98, respectivamente. Com base nessas relações a qualidade do RNA extraído foi considerada adequada para as análises posteriores. A variação das médias de concentração do RNA total foi de 287,3 e 1265 ng/ $\mu$ L (Tabela 4).

A integridade do RNA total foi observada em gel de agarose 1%, onde se pode notar que os RNAs analisados estavam íntegros, visto que, foram visualizadas as bandas dos RNAs ribossômicos 18S e 28S (Figura 15).

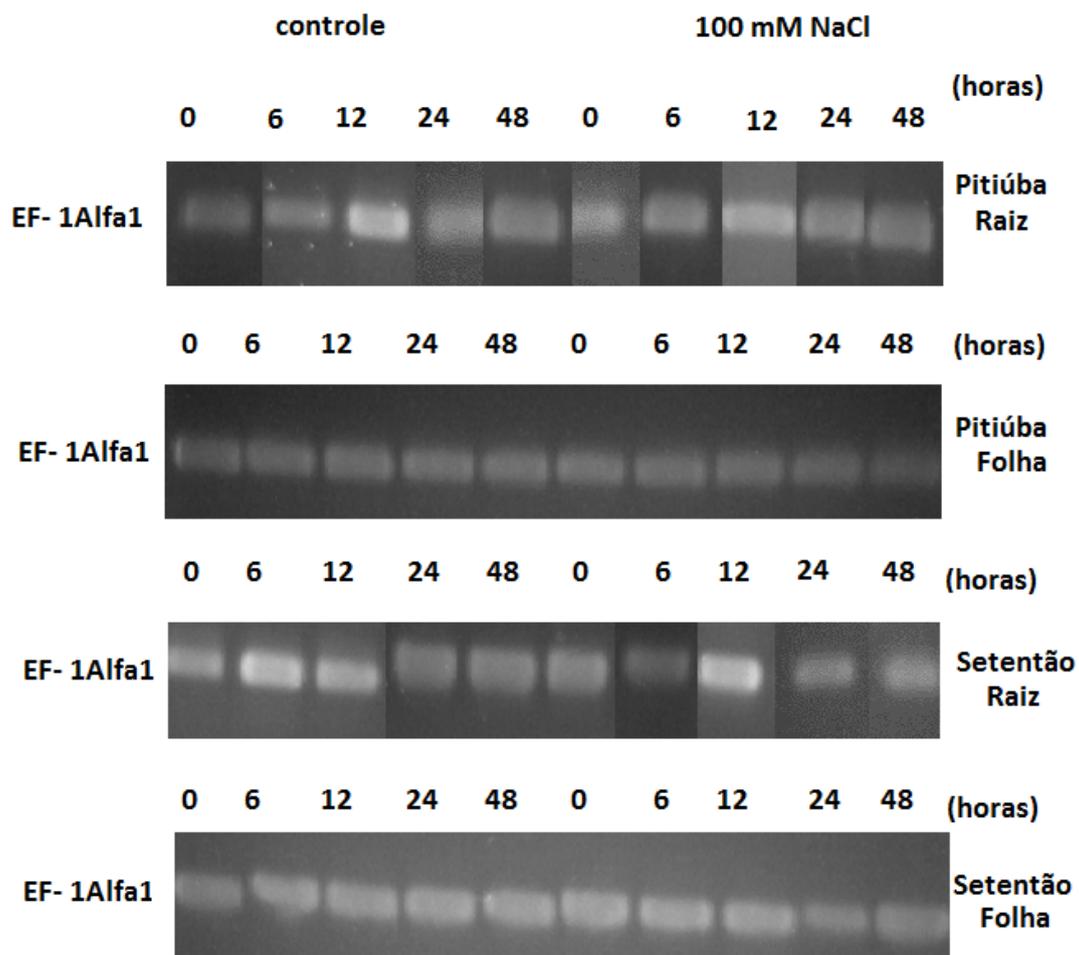
Na figura 16 visualizamos as eletroforeses em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação do gene fator de alongação 1alfa 1(*EF1 $\alpha$ 1*) para avaliação da qualidade do cDNA produzido por PCR semi-quantitativa. Pode-se notar que a presença de uma única banda para cada condição indicou que a amplificação ocorreu de forma eficiente e que as amostras de cDNA encontravam-se em boas condições para a realização das qPCR.

**Tabela 4.** Valores médios das concentrações e razões de absorvâncias dos RNAs extraídos de raízes e folhas de *Vigna unguiculata* (cultivares Pitiúba e Setentão), plantas em condições controle e estresse salino.

CULTIVAR	TRATAMENTO	ÓRGÃO	HORAS	MÉDIA DAS CONCENTRAÇÕES ng/μL	RELAÇÃO 260/280	RELAÇÃO 260/230
PITIÚBA	Controle	RAIZ	0	520,7	2,07	1,89
			6	397,3	2,18	1,69
			12	401,6	2,09	1,88
			24	542,5	2,11	1,73
			48	346,4	2,01	1,87
PITIÚBA	100 mM NaCl	RAIZ	0	312,5	2,07	1,67
			6	427,4	2,09	1,98
			12	287,3	2,07	1,59
			24	397,5	2,12	1,73
			48	459,5	2,07	1,86
PITIÚBA	Controle	FOLHA	0	769,3	2,06	1,81
			6	845,9	2,08	1,73
			12	673,5	2,09	1,76
			24	840,3	2,11	1,89
			48	1023,5	2,09	1,96
PITIÚBA	100 mM NaCl	FOLHA	0	874,9	2,01	1,68
			6	798,3	2,08	1,95
			12	1265,0	2,06	1,97
			24	769,3	2,07	1,70
			48	881,5	2,04	1,76
SETENTÃO	Controle	RAIZ	0	391,0	1,98	1,87
			6	332,7	2,14	1,80
			12	442,7	2,11	1,86
			24	398,0	2,05	1,73
			48	451,9	2,13	1,75
SETENTÃO	100 mM NaCl	RAIZ	0	401,4	2,02	1,79
			6	378,5	2,09	1,69
			12	394,1	2,1	1,82
			24	428,5	2,07	1,86
			48	513,5	2,07	1,75
SETENTÃO	Controle	FOLHA	0	932,4	2,05	1,87
			6	904,6	1,96	1,85
			12	795,2	2,12	1,69
			24	597,3	2,07	1,78
			48	935,0	2,11	1,87
SETENTÃO	100 mM NaCl	FOLHA	0	805,8	2,08	1,86
			6	765,6	2,04	1,79
			12	849,6	2,08	1,89
			24	645,3	2,11	1,96
			48	683,4	2,13	1,85



**Figura 15.** RNA total extraído de raízes e folhas dos cultivares Pitiuba e Setentão nas condições controle e de estresse salino (100 mM de NaCl) visualizados em gel de agarose (1%), após coramento com Brometo de Etídeo.



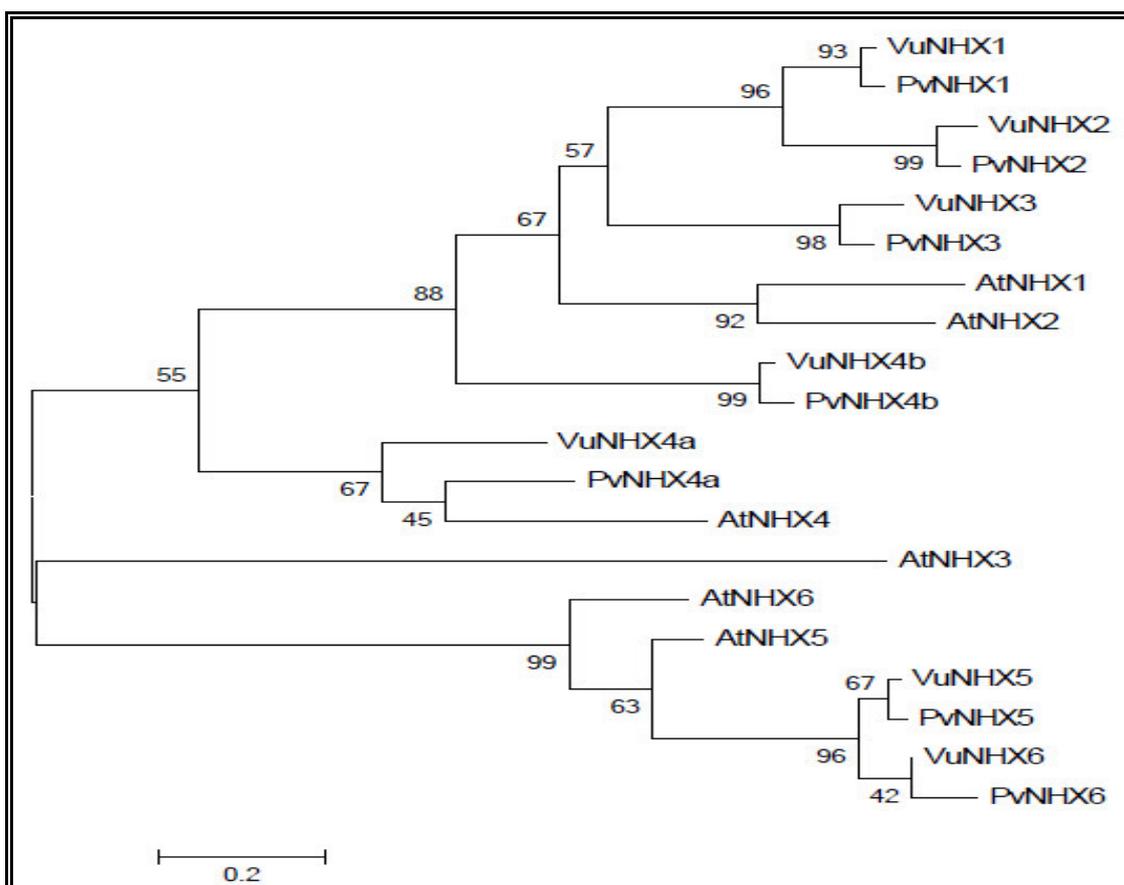
**Figura 16.** Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos de amplificação do gene fator de alongação 1alfa 1 (*EF1 $\alpha$  1*) para avaliação da qualidade do cDNA produzido por PCR semi-quantitativa. Coramento realizado com Brometo de Etídio.

### 5.2.2 Identificação de genes de *Vigna unguiculata* envolvidos no transporte de Na<sup>+</sup>

A partir de sequências obtidas de bancos de dados de *V. unguiculata* foram encontrados os seguintes genes: 1 gene para a subunidade A da H<sup>+</sup>ATPase vacuolar, 2 genes para pirofosfatase, 1 gene para SOS1, 7 genes para a NHX e 13 genes para a H<sup>+</sup>ATPase de membrana plasmática.

### 5.2.2.1 Análises das relações filogenéticas entre os genes das famílias multigênicas NHX e H<sup>+</sup>ATPase de leguminosas:

Devido a detecção de vários genes para a NHX e H<sup>+</sup>ATPase de membrana plasmática (H<sup>+</sup>ATPase tipo P) duas análises filogenéticas foram realizadas em busca de se classificar cada um dos genes membros de ambas as famílias multigênicas (Figuras 17 e 18).



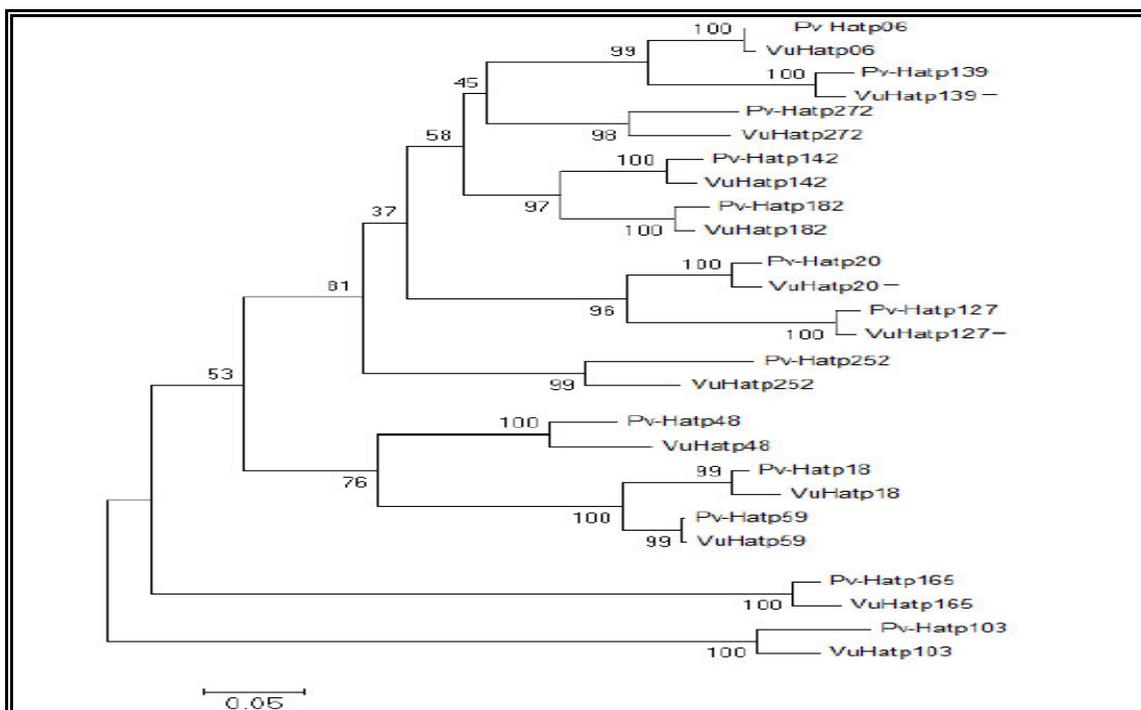
**Figura 17.** Árvore filogenética dos genes NHX de (Pv) *Phaseollus vulgaris* e (Vu) *Vigna unguiculata* e (At) *Arabidopsis thaliana*. A árvore foi construída usando a ferramenta MEGA5.05 empregando o algoritmo "Neighbour-joining".

Para o gene da SOS1 foi encontrado por estudos *in silico* 1 contig em *Vigna unguiculata* com elevada identidade com os genes da AtSOS1 (*Arabidopsis thaliana*), PpSOS1 (*Physcomitrella patens*), OsSOS1 (*Oryza sativa*) de PeSOS1 (*Populus euphratica*).

Para os genes das proteínas translocadoras  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  em vacúolo, em *Arabidopsis thaliana* (AtNHX1, AtNHX2, AtNHX3, AtNHX4, AtNHX5 e AtNHX6) e *Phaseolus vulgaris* (PvNHX1, PvNHX 2, PvNHX 3, PvNHX 4, PvNHX 5 e PvNHX 6) foi encontrado 1 *contig* de cada um em *Vigna unguiculata*, com exceção da NHX4, que apresentou 2 *contigs*.

Foram localizados em *Vigna unguiculata* 2 *contigs* para os genes que codificam as pirofosfatases 1 e 2 de vacúolo em *Arabidopsis thaliana* (ATPpase1 e ATPpase2) e *Phaseolus vulgaris* (PvPpase1 e PvPpase2), também foi localizado em *Vigna sp.* 1 *contig* com elevado grau de similaridade com o gene que codifica a subunidade A da  $\text{H}^+$ -ATPase vacuolar em *Arabidopsis thaliana* (AtVatpSubA) e *Phaseolus vulgaris* (PvVatpSubA).

Os 7 genes NHX de *Phaseollus vulgaris* e *Vigna unguiculata* foram classificados de acordo com as relações filogenéticas apresentadas com os 6 genes NHX de *Arabidopsis thaliana*.



**Figura 18.** Árvore filogenética dos genes  $\text{H}^+$ -atpase (próton atpase de membrana plasmática) de (Pv) *Phaseolus vulgaris* e (Vu) *Vigna unguiculata*.

Já para a  $\text{H}^+$ -ATPase tipo P, os 13 genes identificados em *Vigna unguiculata* foram classificados com base na numeração dos contigs encontrados para os 13 genes

ortólogos da H<sup>+</sup>-ATPase tipo P em *Phaseollus vulgaris* (Figura 18). Em *Arabidopsis thaliana* foram anotados 12 genes.

### 5.2.3 Análise da expressão gênica

A expressão dos genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de Na<sup>+</sup> em *V. unguiculata* foi avaliada através de PCR em tempo real usando 3 genes constitutivos (*Insulinae*, *F-box* e *EF1β*) como genes de referência para a normalização dos dados usando o programa GeNorm. Outros genes constitutivos (*EF1α1*, *EF1α2*, *EF1α3*) também foram avaliados, mas apresentaram baixa estabilidade e não foram usados na normalização dos dados.

Dos genes estudados neste trabalho, observou-se que os genes *HATPase18*, *HATPase59*, *HATPase139*, *HATPase272*, *NHX3*, *NHX4a*, *NHX4b*, não tiveram expressão detectada em *Vigna unguiculata*. Os genes *HATPase20*, *HATPase103*, *HATPase127*, *HATPase142*, *HATPase165*, *HATPase182*, *HATPase252*, *NHX5*, *NHX6* e *Ppase2* foram detectados, mas não apresentaram diferenças no seu perfil de expressão quando submetidas a 100 mM de NaCl. Os demais genes apresentaram alteração no perfil de expressão influenciada pelo estresse salino revelando diferenças entre os cultivares.

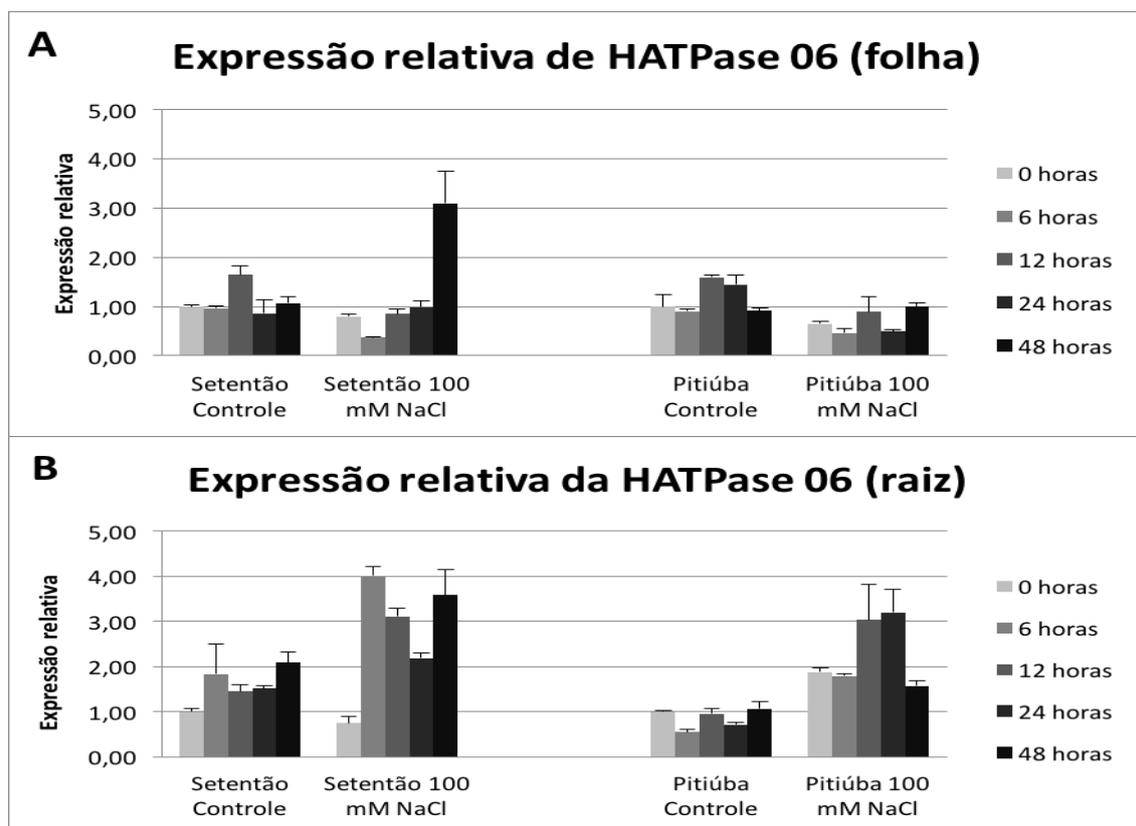
#### 5.2.3.1 Expressão relativa dos genes das H<sup>+</sup>ATPase tipo P de *Vigna unguiculata*

Dois genes H<sup>+</sup>ATPase tipo P (das *HATPases 06 e 48*) tiveram a expressão alterada em resposta ao estresse salino a qual foi dependente do órgão e do tratamento (Figura 19A e B). A figura 19 A mostra que a *HATPase 06* é expressa em folhas nos dois cultivares, tendo sua expressão aumentada em 3 vezes no cv. Setentão em comparação ao cv. Pitiúba no mesmo período de exposição ao sal (48 horas). Pitiúba não revelou mudanças significativas na expressão deste gene em folhas.

Em raízes, o mesmo gene revelou um comportamento diferente (Figura 19B), onde a partir de 6 horas de exposição ao sal, o cultivar Setentão mostrou aumento de 4,3 vezes nos níveis de expressão em relação ao tempo 0 horas. Já em Pitiúba,

observou-se o aumento da expressão nos tempos 12 e 24 horas de exposição ao estresse, onde se notou um aumento de 3 vezes em relação ao seu controle.

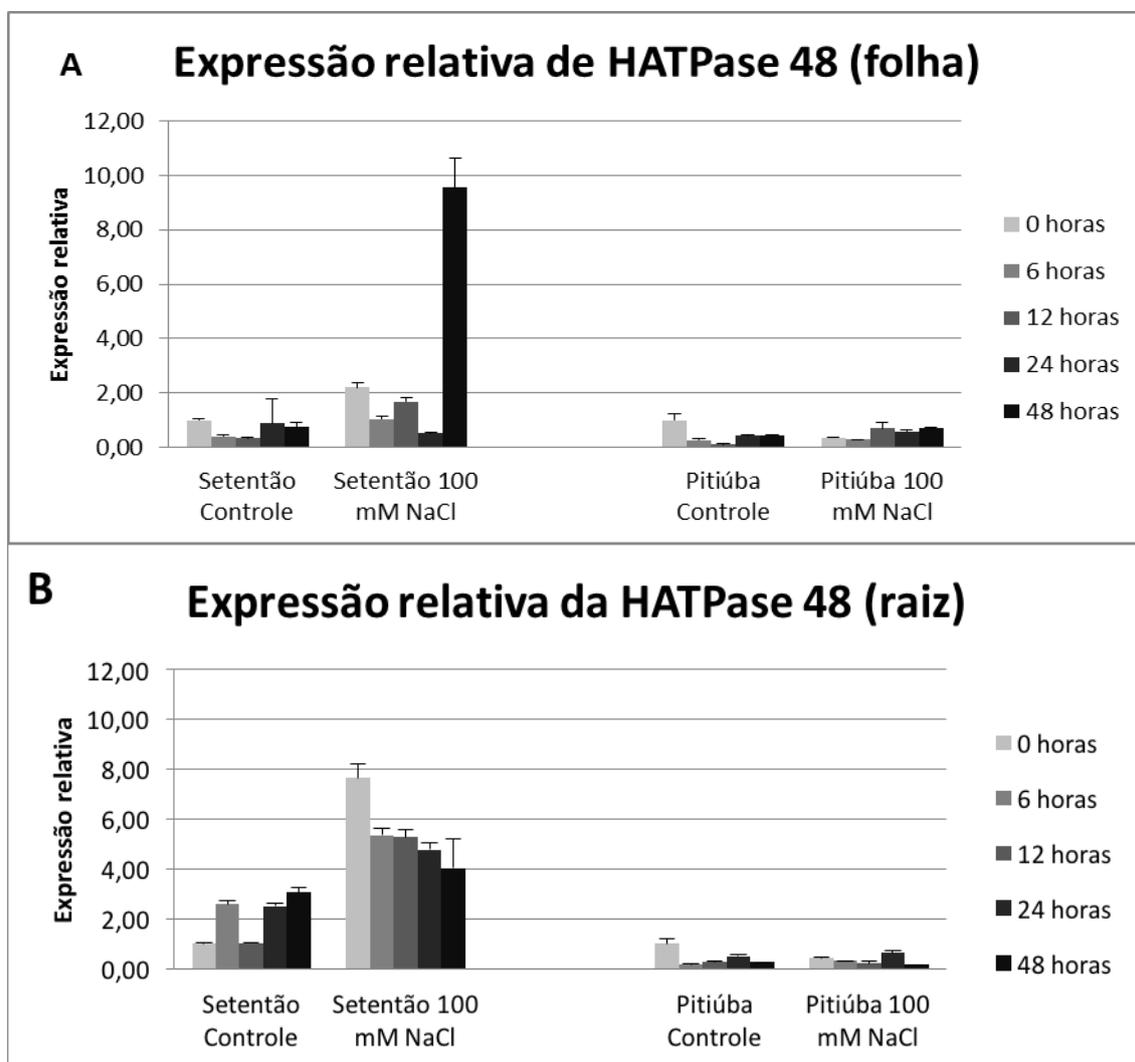
Em relação ao comportamento do gene da *HATPase 48* em folhas (Figura 20A e B), observou-se que sua expressão é constitutivamente baixa. No entanto, no cultivar setentão, no tempo de 48 horas de exposição ao sal, ocorreu um incremento de 10 vezes nos níveis de transcritos em relação ao tempo 48 horas do seu controle. Já o cultivar Pitiúba não revelou variações significantes na expressão em folhas.



**Figura 19.** Expressão relativa do gene *H<sup>+</sup>ATPase 06*. O nível de expressão do gene *H<sup>+</sup>ATPase 06*, foi normalizado usando a expressão dos genes: EF-F1 $\beta$ , IDE e F-box. As amostras foram oriundas de folhas submetidas aos tratamentos controle e 100 mM de NaCl, nos períodos de tempo: 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a aplicação do tratamento em plantas de *Vigna unguiculata* com 10 dias após a semeadura. A – Folhas; B – Raízes. Médias de triplicatas, com desvio padrão.

Em raízes (Figura 20 B), o gene da *HATPase 48* não revelou nenhuma alteração na sua expressão em Pitiúba. Porém, em Setentão a aplicação do NaCl gerou um

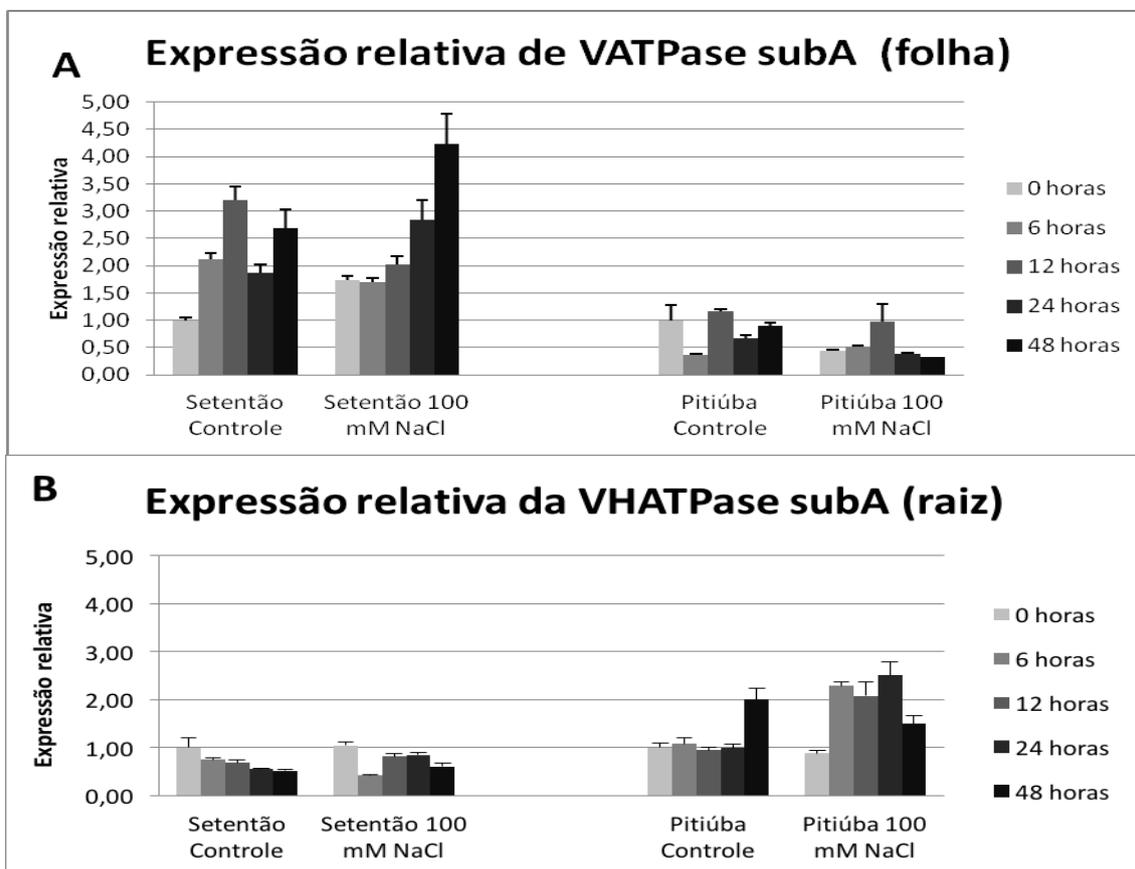
aumento no nível de transcrito na ordem de 4 a 5 vezes, em relação ao seu controle, sendo as maiores expressões nos tempos 6 e 12 horas após aplicação do NaCl.



**Figura 20.** Expressão relativa do gene  $H^+ATPase\ 48$ . O nível de expressão do gene  $H^+ATPase\ 48$ , foi normalizado usando a expressão dos genes: EF-F1 $\beta$ , IDE e F-box. As amostras foram oriundas de folhas e raízes submetidas aos tratamentos controle e 100 mM de NaCl, nos períodos de tempo: 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a aplicação do tratamento em plantas de *Vigna unguiculata* com 10 dias após a semeadura. A – Folhas; B – Raízes. Médias de triplicatas, com desvio padrão.

### 5.2.3.2 Expressão relativa do gene da H<sup>+</sup>ATPase tipo V subunidade A de *Vigna unguiculata*

A análise da expressão por qPCR mostrou que o gene da *VATPase subA* é expresso em raízes e folhas de *Vigna unguiculata*. Contudo, apresenta expressão diferencial dependendo do órgão e do tratamento (Figuras 21A e B). A figura 21A, mostra que o gene da *VATPase subA* é expresso em folhas dos dois cultivares, mas pareceu ser responsivo ao estresse salino apenas no cultivar Setentão, onde observou-se um incremento de 1,5 vezes na expressão no tempo 48 horas em relação ao tempo 0 horas.

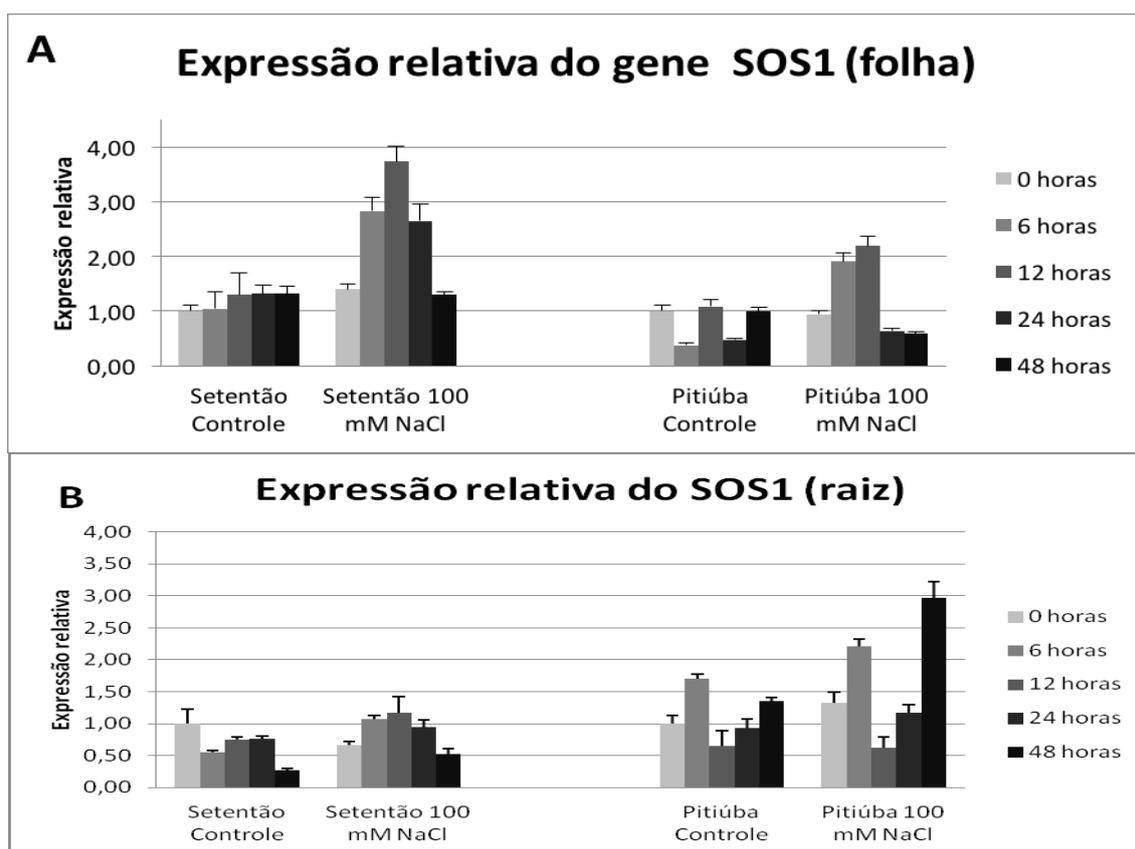


**Figura 21.** Expressão relativa do gene *VuATPase subA*. O nível de expressão do gene *V-ATPase subA*, foi normalizado usando a expressão dos genes: EF-F1 $\beta$ , IDE e F-box. As amostras foram oriundas de folhas e raízes submetidas aos tratamentos controle e 100 mM de NaCl, nos períodos de tempo: 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a aplicação do tratamento em plantas de *Vigna unguiculata* com 10 dias após a semeadura. A – Folhas; B – Raízes. Médias de triplicatas, com desvio padrão.

Em raízes, o mesmo gene mostrou um perfil de expressão diferente (Figura 21B), onde em Pitiúba o contato com o sal aumentou o nível de transcritos em 2,5 vezes no tempo de 24 horas em relação ao tempo 0 horas da aplicação do NaCl. No cultivar Setentão, o gene da *VATPase subA* não mostrou diferenças nos níveis de transcritos em condições de estresse salino.

### 5.2.3.3 Expressão relativa do gene da *SOS1* de *Vigna unguiculata*

A análise de expressão por qPCR mostrou que o gene *SOS1* é expresso em raízes e folhas de *Vigna unguiculata*. Contudo, apresenta expressão diferencial dependendo do órgão e do tratamento (Figuras 22A e B).



**Figura 22.** Expressão relativa do gene *SOS1*. O nível de expressão do gene *SOS1*, foi normalizado usando a expressão dos genes: EF-F1 $\beta$ , IDE e F-box. As amostras foram oriundas de folhas e raízes submetidas aos tratamentos controle e 100 mM de NaCl, nos períodos de tempo: 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a aplicação do tratamento em

plantas de *Vigna unguiculata* com 10 dias após a semeadura. A – Folhas; B – Raízes. Médias de triplicatas, com desvio padrão.

A figura 22 A mostra que o gene *SOS1* é expresso nas folhas dos dois cultivares, sendo mais expresso em Setentão no tempo de 12 horas onde, observou-se aumento na expressão relativa de cerca de duas vezes em relação ao controle. Aumentos na expressão desse gene também foram observados em Pitiúba nos tempos de 6 e 12 horas.

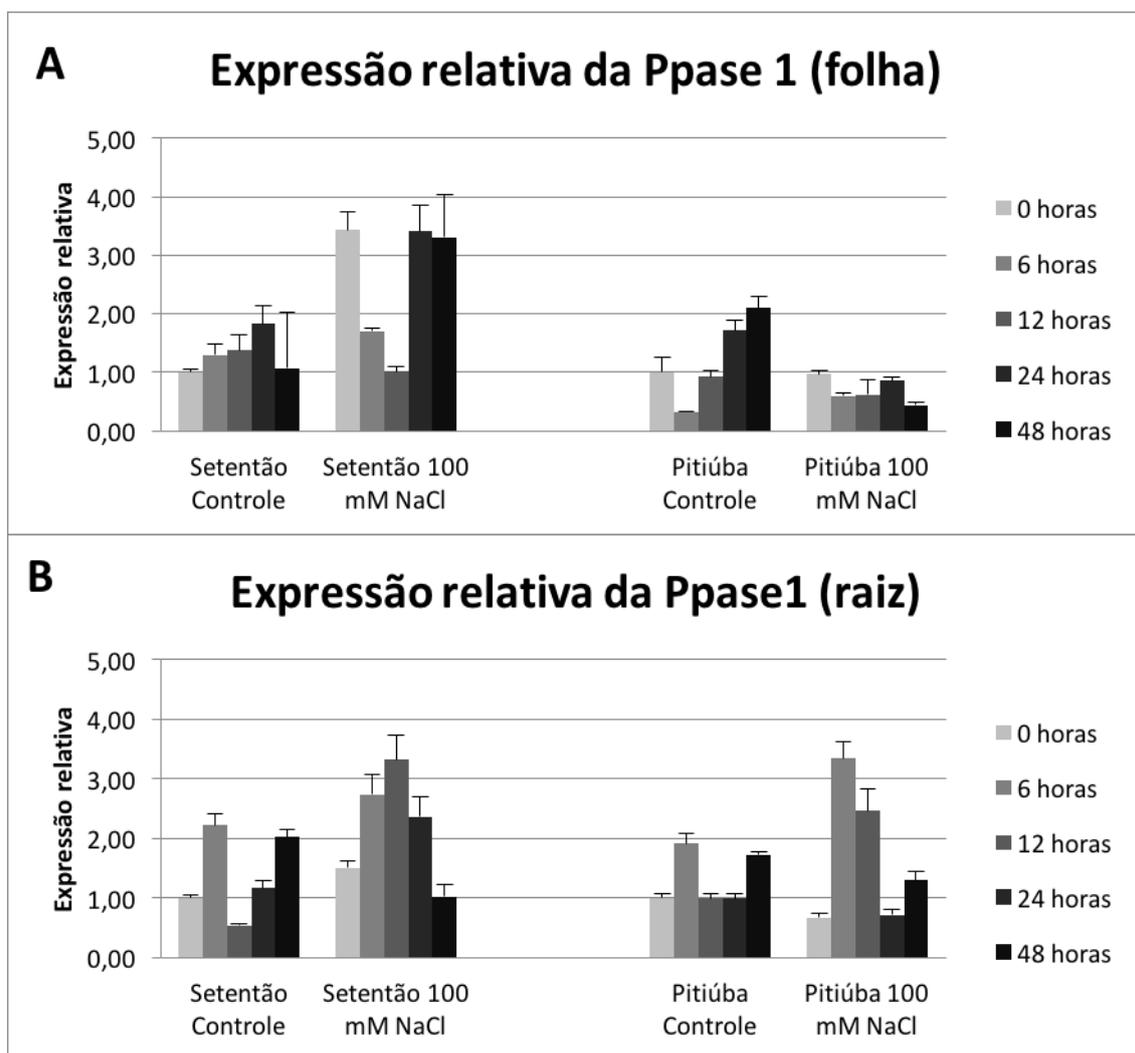
Em raízes, no cultivar Pitiúba, (Figura 22B) observou-se que o gene *SOS1* aumentou o nível de transcritos em duas vezes no tempo de 48 horas de contato com 100 mM de NaCl, ao passo que em Setentão, a presença do sal levou a um aumento na expressão do gene *SOS1* em todos os tempos em relação ao tempo 0 horas.

#### **5.2.3.4 Expressão relativa dos genes da *Ppase1* de *Vigna unguiculata***

A análise de expressão por qPCR mostrou que o gene da *Ppase1* é expresso em raízes e folhas de *Vigna unguiculata*. Contudo, apresenta expressão diferencial dependente do órgão e do tratamento (Figuras 23 A e B).

A figura 23A mostrou que o gene da *Ppase1* é expresso nas folhas dos dois cultivares, sendo mais expresso em Setentão nos tempos de 0, 24 e 48 horas (estresse), onde ocorre um aumento na expressão de 3, 2 e 3 vezes, respectivamente em relação ao controle. Já em Pitiúba, a presença do sal no tempo 48 horas reduziu pela metade a expressão do gene *Ppase1*.

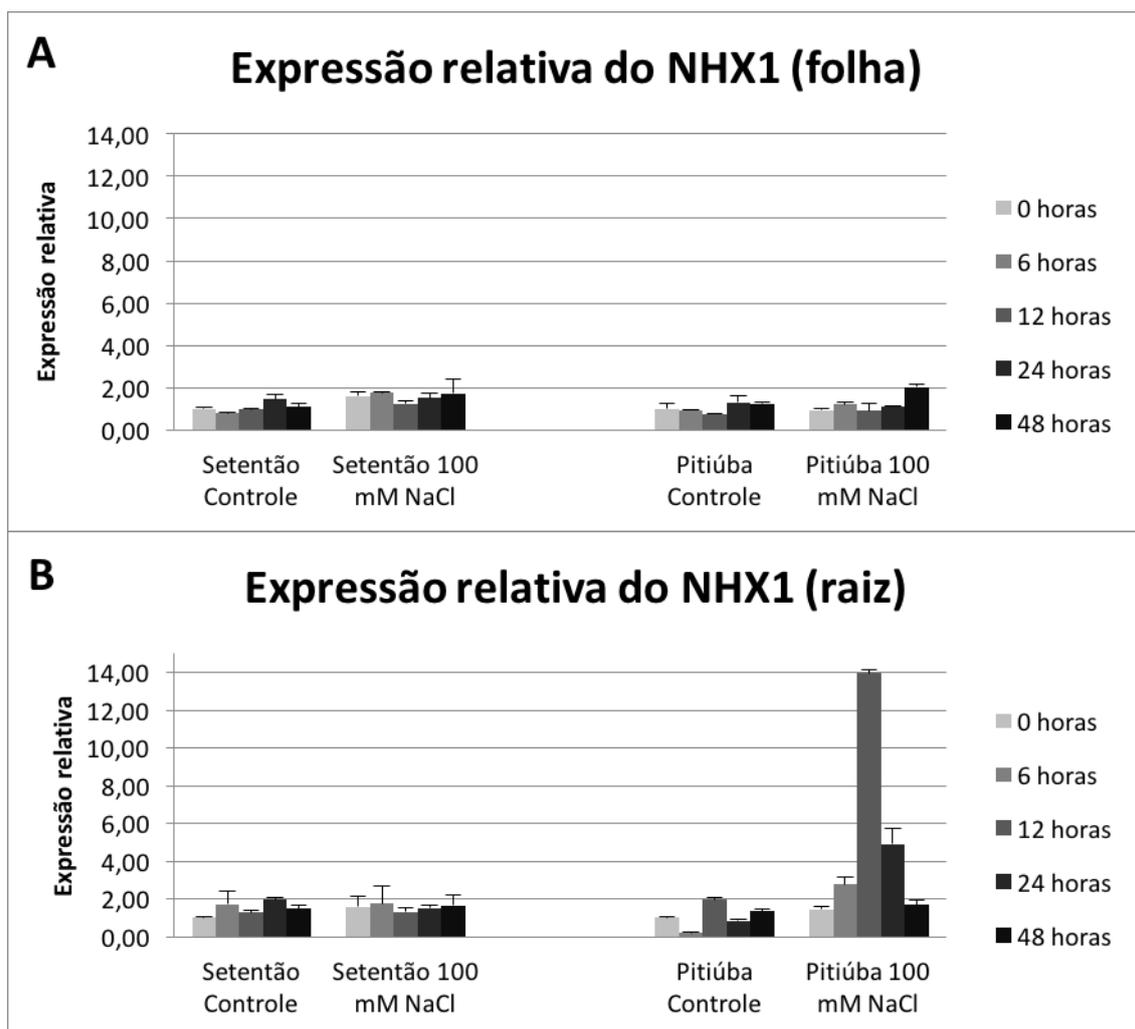
Na figura 23 B tem-se o perfil de expressão do gene da *Ppase1* em raízes, onde, observou-se um pico de expressão nos tempos de 6 e 12 horas de exposição ao sal. Neste tempo, a expressão deste gene foi aumentada em 2,5 (6 horas), 3,5 (12 horas) vezes em Setentão e 5 (6 horas) e 4 (12 horas) vezes em Pitiúba. No tempo de 24 horas de exposição ao sal o cultivar Setentão manteve a expressão do gene da *Ppase1* aumentada em duas vezes em relação ao controle. No entanto, em Pitiúba a expressão do gene passou a não ser mais influenciada pela presença de 100 mM NaCl.



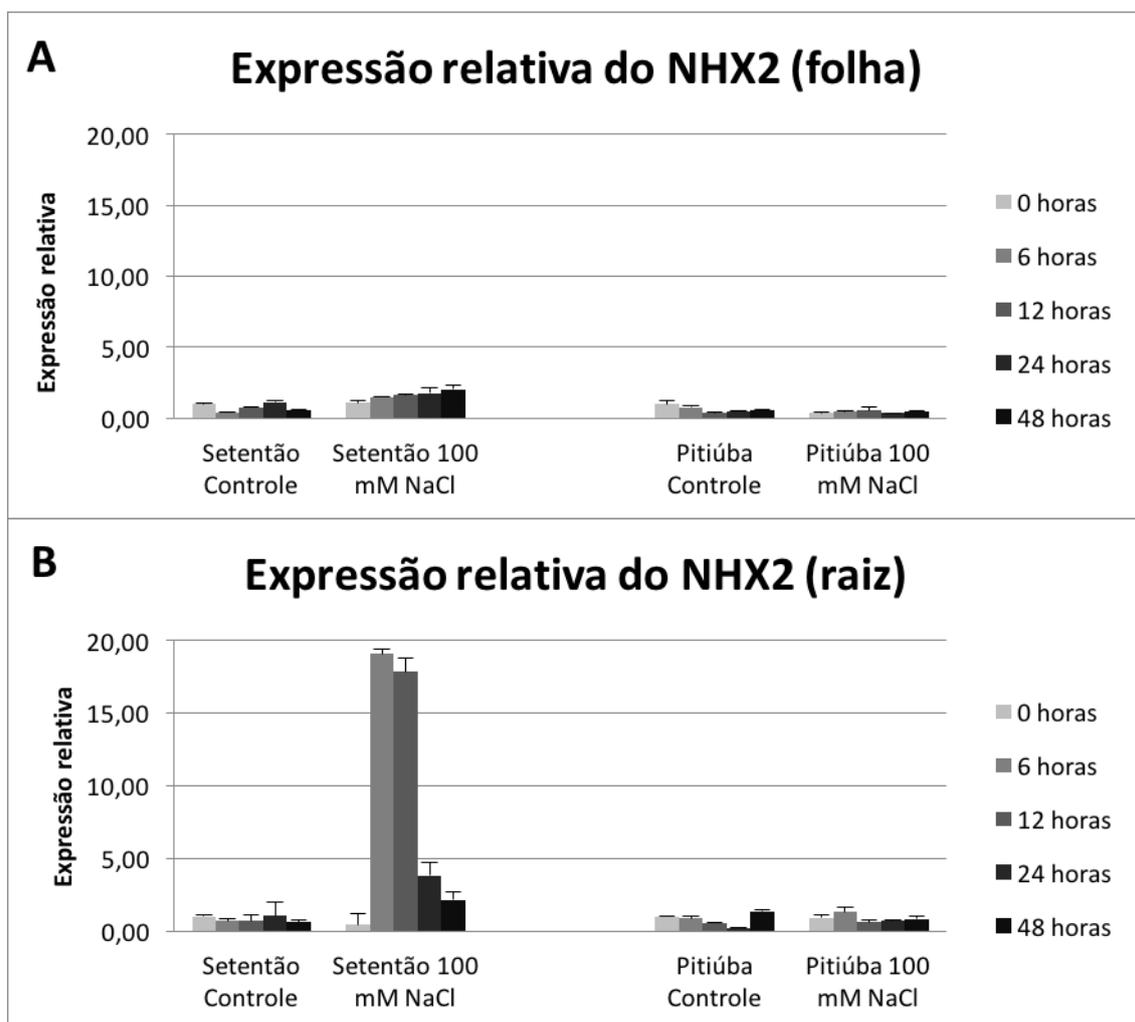
**Figura 23.** Expressão relativa do gene *Ppase1*. O nível de expressão do gene *Ppase1*, foi normalizado usando a expressão dos genes *EF-F1 $\beta$* , *IDE* e *F-box*. As amostras foram oriundas de folhas e raízes submetidas aos tratamentos controle e 100 mM de NaCl, nos períodos de tempo: 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a aplicação do tratamento em plantas de *Vigna unguiculata* com 10 dias após a semeadura. A – Folhas; B- Raízes. Médias de triplicatas, com desvio padrão.

#### 5.2.3.5 Expressão relativa dos genes da NHX de *Vigna unguiculata*

A análise de expressão por qPCR mostrou que os genes da *NHX 1* e *NHX 2* são expressos em raízes e folhas de *Vigna unguiculata*. Contudo, apresentam expressões diferenciadas dependente do órgão e do tratamento (Figuras 24A, 24B, 25A e 25B).



**Figura 24.** Expressão relativa do gene *NHX1*. O nível de expressão do gene *NHX1*, foi normalizado à expressão dos genes *EF-F1 $\beta$* , *IDE* e *F-box*. As amostras foram oriundas de folhas e raízes submetidas aos tratamentos controle e 100 mM de NaCl, nos períodos de tempo: 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a aplicação do tratamento em plantas de *Vigna unguiculata* com 10 dias após a semeadura. A – Folhas; B – Raízes. Médias de triplicatas, com desvio padrão.



**Figura 25.** Expressão relativa do gene *NHX2*. O nível de expressão do gene *NHX2*, foi normalizado à expressão dos genes *EF-F1 $\beta$* , *IDE* e *F-box*. As amostras foram oriundas de folhas e raízes submetidas aos tratamentos controle e 100 mM de NaCl, nos períodos de tempo: 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a aplicação do tratamento em plantas de *Vigna unguiculata* com 10 dias após a semeadura. A – Folhas; B – Raízes. Médias de triplicatas, com desvio padrão.

## 6 DISCUSSÃO

No presente trabalho avaliou-se como o crescimento das plantas de *Vigna unguiculata* foi influenciado pela salinidade, usando como modelo biológico dois cultivares Pitiúba e Setentão. Visualmente foi observado-se (Figura 5) que as plantas do cultivar Setentão foram muito mais afetadas pela salinidade que as do cultivar Pitiúba, constatando-se que, em Setentão, a aplicação de 100 mM NaCl levou a uma perda de turgor dos tecidos foliares (Figura 5A).

A perda de turgor foliar é esperada devido ao fato da folha ser o órgão mais afetado, principalmente nas horas iniciais de estresse (ESTEVEES & SUZUKI, 2008). Esse resultado está de acordo com os de Shabala e Cuin (2007) que afirmam que o turgor da célula vegetal é prontamente reduzido, levando a uma redução substancial na elongação das folhas e raízes, tendo sido observado dentro de minutos após o início do estresse salino.

A perda de turgor persistiu por mais de 24 horas, onde a desidratação foliar foi facilmente evidenciada comparando-se os dois cultivares em condições de NaCl 100 mM (Figura 5D). Em Pitiúba, também houve uma leve perda de turgor logo após a submissão do estresse, a qual foi revertida em 6 horas (Figura 5B). Isso sugere que o choque osmótico causado pela aplicação do NaCl levou a uma alteração no *status hídrico* da planta muito mais intensa e duradoura no cultivar Setentão quando comparado com o cultivar Pitiúba (Figura 5C e 5D). Resultados semelhantes de perda de turgor também foi observado em milho (CONUS *et al.*, 2009).

A caracterização de uma espécie em sensível ou tolerante ao NaCl não parece ser uma tarefa tão simples, principalmente quando se trabalha com espécies ou cultivares com características ainda pouco estudadas. Estudos demonstraram que há muita variação num mesmo parâmetro tanto em eudicotiledôneas quanto em monocotiledôneas para que se possa relacioná-lo a tolerância ou susceptibilidade ao NaCl (MUNNS, 2002; MUNNS & TESTER, 2008). Observou-se que a utilização de um único parâmetro pode induzir a erro, então, em geral alguns parâmetros foram eleitos como parâmetros chaves para esta classificação, dentre eles; a massa seca, a área foliar, a relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e a razão Raiz/Parte aérea (COSTA *et al.*, 2003; ESTEVEES, B.S & SUZUKI, 2008).

A aplicação do NaCl causou inibição da massa seca de raízes, em especial no cultivar Setentão (63,24%) na concentração de NaCl 100 mM (Figura 6A). Este estresse

causa inibição do crescimento radicular, em especial nas primeiras horas de contato com o agente estressante (SI *et al.*, 2009). O cultivar Pitiúba teve sua maior inibição (42,5 %) na concentração de 75 mM (Figura 6A). Contudo, prontamente foi retomada aos valores do controle na concentração de 100 mM, sugerindo que este cultivar foi menos afetado, dessa forma conseguiu continuar realizando suas atividades de biossíntese numa taxa próxima da normalidade.

Em relação a massa seca dos caules (Figura 6B) dos dois cultivares, a aplicação do NaCl não causou alterações estatisticamente significantivos. Isto pode ser devido ao fato do caule funcionar como uma ponte de transporte de seivas e como estrutura para vencer a competição pela luz (CASTRO & GARCIA, 1996). Por se tratar de plantas com 15 dias (após a sementeira) crescidas em ambiente com iluminação adequada, a competição pela luz não se instalou.

As plantas já se encontravam no estágio onde prevalece o crescimento das raízes e folhas, em detrimento do crescimento caulinar. Assim, o crescimento do caule não estava estimulado no momento da aplicação do NaCl, portanto, o parâmetro pouco afetado pelo sal. Observou-se inibição (22,85%) apenas no cultivar Setentão, na concentração 100 mM NaCl, indicando que a massa seca dos caules foi mais afetada pelo NaCl no cv. Setentão que no Pitiúba, sugerindo o último como menos sensível ao sal que o primeiro.

Nas folhas (Figura 6C), observou-se que a concentração 75 mM NaCl causou um aumento da massa seca de 33% em Setentão e 52,4 % em Pitiúba, indicando que nas mesmas condições de salinidade o cv. Pitiúba consegue manter melhor sua regulação homeostática, evidenciada pelo maior aumento da massa seca de folhas. Sérvulo *et al.*, (2008) observaram redução da massa seca em folhas de dois cultivares de mamoneira submetidos ao estresse salino e classificaram o cultivar mais tolerante como aquela que foi menos inibido pelo sal.

O efeito do NaCl no tamanho das raízes e caules dos dois cultivares de *Vigna unguiculata*, revelou (Figura 7A) que em ambos os cultivares a concentração 100 mM de NaCl não causou inibição significativa no crescimento radicular. Este fato pode ser devido ao tempo (5 dias) de exposição ao NaCl que pode ter sido insuficiente para desencadear mecanismos de inibição de crescimento radicular, apesar do cultivar Setentão ter apresentado raízes maiores que Pitiúba na presença de 100 mM de NaCl.

Em relação ao comprimento do caule (Figura 7B), estatisticamente o sal não causou alteração no comprimento. Este fato é apoiado pela ausência de alteração na massa seca de caules sob influência do NaCl, nos dois cultivares.

A razão Raiz/Parte aérea (R/PA) (Figura 7C) depende do comprimento das raízes, caules e folhas, nos dois cultivares não ocorreram variações expressivas nestes dois primeiros parâmetros, apenas na área foliar onde ocorreu uma inibição em Setentão. No entanto, Setentão apresentou as maiores R/PA em relação a Pitiúba, devido aos maiores comprimentos de raízes deste cultivar, quando comparado a Pitiúba, que, também apresentou caules ligeiramente mais compridos que os de Setentão.

A partir desses resultados, observou-se que os parâmetros de crescimento de raízes e caules não foram conclusivos para a caracterização de qual dos dois cultivares é mais sensível ao estresse salino. Assim, não ocorreram diferenças significativas em relação a influência das concentrações de NaCl no comprimento de raízes e caules dos cultivares. Diferentemente do que já foi observado em outros cultivares de *Vigna unguiculata* (OLIVEIRA, 2007; NEVES, 2008).

Um dos parâmetros mais relevantes para indicação de susceptibilidade ao estresse salino é redução da área foliar (Figura 9) (ZHANG & BLUMWALD, 2001), pois, a capacidade de manter o crescimento do limbo (área foliar) é indispensável para a manutenção da taxa fotossintetizante segundo Khan (1999). Desta forma, para a manutenção do seu *status* energético, indispensável para se aclimatar ao estresse salino. O cultivar Pitiúba conseguiu manter uma maior área foliar no estresse salino (75 e 100 mM) em relação ao cultivar Setentão. Portanto, este parâmetro indicou que Pitiúba consegue manter uma maior área para captação de energia luminosa e realização de fotossíntese. Este fato é um forte indicador que auxiliou na classificação de Pitiúba como um cultivar mais tolerante ao estresse salino quando comparado ao Setentão (ZHU, 2001).

Para uma planta aclimatar-se ao ambiente salinizado ela precisa desenvolver mecanismos para a detecção de elevadas concentrações de íons na rizosfera, as quais estão associadas ao gradiente osmótico (solo-pêlos radiculares) que leva a saída de água da planta para o solo (osmose reversa) (TAIZ & ZEIGER, 2013). Para prevenir isso, a planta precisa ter mecanismos para a percepção destes sinais indicadores das condições desfavoráveis. Bem como, ter mecanismos de resposta a aclimação ao estresse salino.

Estes mecanismos, normalmente, apresentam uma resposta integrada e modulada de vários processos bioquímicos, coordenados por mecanismos de controle da expressão dos genes de tolerante ao estresse salino. Muitas vezes estes produtos gênicos funcionam não somente nos mecanismos de adaptação ao estresse, mas também na regulação da expressão gênica e na transdução de sinais (SI *et al.*, 2009).

Durante a determinação do percentual de água nos órgãos de Setentão e Pitiúba, de modo geral não foram detectadas variações estatisticamente significativas nas raízes entre os dois cultivares (Figura 8A). Contudo, em caules observou-se que Setentão apresentou um percentual de água superior ao de Pitiúba na presença de 100 mM de NaCl em comparação aos respectivos controles (Figura 8B).

Dessa forma, Setentão conseguiu manter mais água no caule e este dado pode estar associado ao fato de Setentão mesmo em condições controle, já apresentar caules com concentrações maiores de prolina 8,5% maiores que os de Pitiúba. A entrada de água é fundamental para a manutenção do turgor celular (KHAN *et al.*, 1999), que esta associado ao crescimento celular, para a entrada d'água a capacidade de se manter osmoticamente regulado é fundamental (YOKOI *et al.*, 2002).

Nas folhas (Figura 8C), observou-se a diferença entre os dois cultivares Setentão (89,13%) e Pitiúba (87,17%) na presença de 100 mM de NaCl.

As folhas com o maior percentual de água (90,47%) foram encontradas em Setentão submetido a 25 mM NaCl. Correlacionado o percentual de água nas folhas a concentração do iminoácido prolina, percebemos que este é 23,5% mais concentrado em Setentão que em Pitiúba (condição de 25 mM de NaCl). Fato que, pode relacionar-se com a maior capacidade de reter água (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Plantas que conseguem manter mais água em suas folhas conseguem se manter mais ativas metabolicamente. Já que, a folha é órgão vegetal mais ativo metabolicamente (KHAN *et al.*, 1999; XUE *et al.*, 2004).

Um dos processos que requer regulação precisa é a manutenção da razão  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , sem a qual a planta entraria num ciclo degradativo de crescente degeneração metabólica (PIZZARO, 2010).

Em *Vigna unguiculata*, observou-se que a concentração de  $\text{Na}^+$  solúvel em raízes sob estresse salino (NaCl 100 mM) (Figura 19A), foi aumentada 16,27% em Pitiúba e 78,09% em Setentão, em relação aos respectivos controles.

Sabe-se que a regulação na entrada de sódio é indispensável para a aclimação da planta ao ambiente salino (BLUMWALD, 2000), os dados sugerem que a regulação

da entrada do sódio nas raízes de Pitiúba foi realizada de maneira mais eficiente, do que em Setentão. Pois, com o aumento da exposição das raízes aos íons sódio nos tratamentos crescentes (25, 50, 75 e 100 mM de NaCl) os aumentos da concentração de sódio solúvel em Setentão foram maiores que em Pitiúba.

Corroborando com esse fato, observou-se também em caules (Figura 10B), que em Setentão os íons Na<sup>+</sup> aumentaram de forma mais expressiva conforme as raízes foram exposta a concentrações maiores de NaCl, em 25 mM 19,8%, em 50 mM 50,76%, em 75 mM 70,64% e em 100 mM 97,43%. Para Pitiúba nas concentrações de 75 e 100 mM de NaCl também observou-se aumentos na concentração de Na<sup>+</sup>, porém, em valores menores 8,03 % e 30,16% respectivamente. Padrão semelhante foi encontrado por Alonso e Rubio (2006).

Este padrão nos indica que o cultivar Pitiúba atua reduzindo a ascensão dos íons Na<sup>+</sup> para a parte aérea. O que é fundamental para a manutenção da taxa metabólica.

Nas folhas (Figura 10C) de ambos os cultivares, a concentração de sódio solúvel não apresentou diferenças estatisticamente significativas nos controles.

Da mesma forma que em raízes e caules, observou-se que o cultivar Pitiúba apresenta algum mecanismo que minimiza o deslocamento do Na<sup>+</sup> pela planta até chegar as folhas, sendo este processo mais eficiente para impedir a ascensão dos íons sódio para as folhas que em Setentão, onde detectou-se sob 100 mM de NaCl um aumento de 40,46%, contra 21,64% em Pitiúba.

Esses dados são semelhantes aos obtidos para feijão-de-corda por Sobreira (2011), Costa *et al.*, (2003) e Oliveira (2007). Esses autores mostraram que a concentração de sódio solúvel em folhas e raízes de cultivares de *V. unguiculata* aumentaram significativamente em resposta à salinidade.

Pode-se destacar que nos dois cultivares estudados no presente trabalho, a raiz foi o órgão de diferenciação para a concentração do sódio. Similar ao observado por Chaves *et al.* (2003).

Nossos dados foram semelhantes aos obtidos por Fernandes de Melo *et al.*, (2005) que demonstraram, que plantas com a capacidade de manter íons Na<sup>+</sup> em maior quantidade nas raízes minimizando o transporte desse íon para a parte aérea das plantas, e isso é uma resposta característica de plantas de *V. unguiculata* submetidas ao estresse salino.

Segundo Alexandersson *et al.*, (2004), estudando *Arabidopsis*, a resposta de distribuição do sódio pela planta é diferenciada, dependendo da forma como a planta percebe o estresse (moderado ou severo).

Independente da entrada do sódio na célula, sua presença em torno dela já é suficiente para interferir de forma prejudicial na absorção do íon potássio pela célula (PIZZARO, 2010).

Neste estudo, quando a concentração de  $K^+$  solúvel foi medida nas raízes de feijão-de-corda (Figura 11A). Observou-se em Setentão que, a exposição ao NaCl 100 mM reduziu a concentração de  $K^+$  em 40% comparativamente ao controle. Entretanto, em Pitiúba, as diferentes concentrações de NaCl não causaram alterações estatisticamente significativas, exceto 100 mM que causou um aumento na concentração do  $K^+$  (58,11%).

Nos caules (Figura 11B) de Pitiúba apenas o tratamento de 100 mM de NaCl causou um incremento de 69,61% na concentração de  $K^+$ , enquanto que, em Setentão, a aplicação de concentrações crescentes de NaCl (25, 50, 75 e 100 mM) não geraram aumentos estatisticamente significantivos na concetração do  $K^+$ .

Em folhas (Figura 11C), observou-se que apenas a condição de 100 mM de NaCl em Pitiúba, foi capaz de aumentar a concentração de  $K^+$ , revelando aumento de 32,82% em Pitiúba, quando comparados ao controle. Já em Setentão, a aplicação das diferentes concentrações de NaCl não gerou alteração estatisticamente significativas.

Observou-se que a concentração de 100 mM de NaCl está associada, a uma alteração no padrão de entrada de  $K^+$  e na sua acumulação em raízes, caules e folhas (Figura 11A, 11B e 11C). Revelando ser esta uma concentração impactante sobre os dois cultivares Setentão e Pitiúba.

Nas glicófitas, a tolerância ao estresse salino pode ser atribuída a capacidade para manter baixas concentrações de  $Na^+$  ou alta relação  $K^+/Na^+$ , sendo esta relação fundamental para o funcionamento celular de forma homeostática (RUBIO; GASSMANN; SCHROEDER, 1995; PIZARRO, 2010).

Os vegetais ao longo da evolução vêm desenvolvendo mecanismos para limitar alterações nas concentrações homeostáticas do íon  $Na^+$ , fato este bem estudado em halófitas (FLOWERS, 2004). Dentre estes mecanismos destacam-se a exclusão do  $Na^+$  da célula e ou sua compartimentalização no vacúolo, visando adaptar-se ao estresse salino (YU *et al.*, 2007, CHINNUSAMY *et al.*, 2006). A exclusão destes íons esta

associada à via SOS (CHOI *et al.*, 2011). Já a sua compartimentalização esta correlacionada aos transportadores NHX vacuolares.

Estudados com várias espécies de plantas (CHRISPEELS *et al.*, 1999; FUKUDA *et al.*, 2004; GREENWAY & MUNNS, 1980) tem demonstrado que, as espécies tolerantes tentam barrar o transporte de  $\text{Na}^+$  para a parte aérea, minimizando o efeito prejudicial deste íon no metabolismo (AGARWAL *et al.*, 2013).

A razão  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  encontrada no citoplasma de células de raízes depende em parte da atividade do sistema de transporte de  $\text{K}^+$  localizado na membrana plasmática (PIZARRO, 2010). Este sistema é o principal responsável pela absorção de  $\text{K}^+$  e de regulação da concentração intracelular desse elemento em ambientes nos quais sua absorção é limitada pela presença de outros íons positivos (FUKUDA *et al.*, 2004). Portanto, acredita-se que o aumento na atividade e, principalmente, nas propriedades seletivas dos transportadores envolvidos na absorção de  $\text{K}^+$  de alta afinidade representa um importante mecanismo de aclimatação a salinidade (RUBIO; GASSMANN; SCHROEDER, 1995).

O íon  $\text{Na}^+$  não é considerado um macronutriente essencial. Contudo, sua adição ao meio em pequenas doses, pode promover o crescimento das plantas quando o suprimento do  $\text{K}^+$  é limitado (MASSER; GIERTH; SCHROEDER, 2002).

Apesar do  $\text{Na}^+$  poder substituir ao  $\text{K}^+$  nas suas funções osmóticas dentro do vacúolo de halófitas, um excesso dele no citoplasma é indesejável, pois inibe várias das reações metabólicas que ocorrem nesse compartimento (ASHLEY; GRANT; GRABOV, 2006).

Tem sido estabelecido que o influxo de  $\text{Na}^+$  se dá principalmente através do sistema de absorção do  $\text{K}^+$  de baixa afinidade devido a sua menor capacidade seletiva para discriminar entre ambos os íons (HARO *et al.*, 2010). Entretanto, o efeito do  $\text{Na}^+$  sobre o sistema de alta afinidade ainda é alvo de várias pesquisas, devido a sua importância para o crescimento da planta e seu papel no mecanismo de tolerância a salinidade (CHRISPEELS; CRAWFORD; SCHROEDER, 1999; ASHLEY; GRANT; GRABOV, 2006).

Os dados indicam que em  $\text{NaCl}$  100 mM parece ocorrer uma alteração no mecanismo de compartimentalização iônica. Pois, a partir desta concentração passamos a observar aumentos na concentração de potássio solúvel, acompanhado também por um aumento na concentração do  $\text{Na}^+$  solúvel. Parece ocorrer uma mudança na absorção de cátions monovalentes normalmente competitivos ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ). A maior absorção de  $\text{K}^+$

em Pitiúba, pode estar associada à expressão e tradução de novos transportadores de  $K^+$  de alta afinidade (HARO *et al.*, 2010; PIZARRO, 2010).

Os transportadores de  $K^+$  de alta afinidade são estimulados pelo aumento na concentração dos íons  $Na^+$  (RUBIO; GASSMANN & SCHROEDER, 1995).

Em caules (Figura 11B) de Pitiúba, o tratamento 100 mM de NaCl, causou um incremento (69,61%) na concentração de  $K^+$ . Neste mesmo órgão em Setentão observou-se um incremento de 13,13% do íon  $K^+$  sob 100 mM de NaCl. Contudo, este aumento na acumulação de  $K^+$  não foi acompanhado por uma redução na acumulação de sódio indicando haver outros mecanismos de absorção de  $K^+$  que passam a ser expressos na concentração de 100 mM NaCl (PIZZARO, 2010).

Nas folhas (Figura 11C), 100 mM de NaCl foi o único tratamento que causou um aumento da acumulação de  $K^+$  e apenas em Pitiúba 32,82%, revelando que Pitiúba tem algum mecanismo que favorece a absorção do  $K^+$  em relação a Setentão.

Em oposição aos nossos resultados para Pitiúba sob aplicação de 100 mM de NaCl, Sobreira (2009) encontrou menores concentrações de  $K^+$  em plantas de *Vigna* submetidas ao estresse salino (NaCl 100 mM), em relação as concentrações encontradas nos controles. Zahran *et al.*, (2007) também encontraram dados indicando que no estresse salino ocorre uma redução na acumulação do potássio. Estudos em culturas como *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, *Zea mays* e *Hordeum vulgare* mostram aumento na atividade dos transportadores de  $K^+$  de alta afinidade quando estas culturas são expostas a altas concentrações de sódio (PIZZARO, 2010).

É indispensável que a planta mantenha uma baixa razão  $Na^+/K^+$  para prevenir a toxicidade iônica causada pelo  $Na^+$ , que atua competitivamente pelos canais não seletivos de  $K^+$ , sendo o potássio requerido para ativar mais de 50 enzimas, que passam a ter sua ação desregulada pela excesso de sódio que se liga competitivamente ao sítio do potássio (BHANDAL & MALIC, 1998).

Tanto um aumento da concentração dos íons sódio quanto o aumento da razão  $Na^+/K^+$  são metabolicamente preocupantes.

Nas figuras (12A, 12B e 12C) são mostradas as razões  $Na^+/K^+$  para raízes, caules e folhas respectivamente, para estes órgãos observou-se as maiores reduções dessas relações sob 100 mM de NaCl para Pitiúba e um aumento dessa razão para Setentão, comparando-se com os respectivos controles.

Para as raízes de Setentão em 100 mM de NaCl observou-se um aumento na razão  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de 96,46%, para os caules de Setentão um aumento de 74,61% e para as folhas um aumento de 47,24%. Porém, em Pitiúba a aplicação de 100 mM de NaCl causou nas raízes uma inibição da razão  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de 25,76%, %, para os caules de Pitiúba uma redução de 32,97% e para as folhas uma redução de 8,4%, comparando ao seu controle.

Nesse contexto, foi relatado que plantas com habilidade para manter a razão  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  reduzida têm maior capacidade de adaptar-se a ambientes salinos (ALONSO *et al.*, 2006; RENGEL & DAMON, 2008). Indicando ser Pitúba mais tolerante ao estresse salino.

O estresse salino além da toxicidade iônica também está associado a estresse osmótico que é caracterizado pela redução da captação de água ou até mesmo na perda de água. Uma das formas da planta prevenir esse estresse é através da síntese de solutos compatíveis como, prolina, betaína ou álcool de carboidratos, os quais podem ser sintetizados sem causar prejuízos metabólicos para as células vegetais (GUPTA & HUANG, 2014). Alguns autores têm relatado que o aumento da concentração de prolina nem sempre é considerado um aumento na capacidade de aclimação ao estresse salino, mas sim, que sua acumulação seria simplesmente uma decorrência de distúrbios metabólicos, no metabolismo de aminoácidos e proteínas (QUÉROA *et al.*, 2014). Podendo ser também um mecanismo de resposta a este distúrbio (MELONI *et al.*, 2004; STRANGE *et al.*, 2004).

As figuras 13A, B e C mostram respectivamente a concentração de prolina ( $\mu\text{moles. g}^{-1}\text{ms.}$ ) em raízes, caules e folhas nos dois cultivares estudados.

Em raízes de Setentão expostas a 100 mM de NaCl não ocorreu aumento na síntese de prolina. Já em Pitiúba, ocorreu uma redução de 40,65%.

Nos caules, foram observados aumentos de prolina em Setentão nas condições de 25, 50 e 75 mM de NaCl. Já em 100 mM de NaCl, os valores foram inferiores aos do controle (27,6%) (Figura 13B).

Para Pitiúba, o maior aumento (25%) ocorreu na presença de 50 mM NaCl e em 100 mM de NaCl, foi observado uma redução de 21,1% na concentração de prolina.

Em folhas, observou-se em Pitiúba que a concentração inicial de prolina (controle) é maior (22,18%) que a mesma em Setentão. Na presença de 100 mM de NaCl há um aumento de 48,81% na concentração de prolina em Setentão e uma redução de 37,36% em Pitiúba, indicando comportamentos distintos na síntese de

prolina nos dois cultivares, em resposta ao estresse salino. Esta maior concentração inicial de prolina em Pitiúba pode indicar que o iminoácido prolina já é sintetizado em maior quantidade (constitutivamente), o que pode ser uma pré-adaptação ao solo com maior quantidade de sais.

Silva *et al.* (2011), estudando pinhão manso, observaram não haver aumento expressivo da concentração de prolina em plantas submetidas a estresse salino. Santos *et al.* (2002), estudando estresse hídrico em trigo, observaram que o aumento dos teores de prolina poderia ser atribuído ao aumento das atividades das enzimas envolvidas na síntese deste iminoácido (KANDPAL & RAO, 1982) ou à inibição da oxidação da prolina (KIYOSUE *et al.*, 1996; QUÉROA *et al.*, 2014).

Apesar de ser útil na osmorregulação, a síntese desse soluto compatível, é energeticamente dispendiosa para a célula e gera um agravante do estresse osmótico que é também a indução do estresse oxidativo (TESTER; DAVENPORT, 2003), este, por sua vez pode acarretar maior peroxidação de lipídios membranares, aumento nos níveis de peroxidação de lipídios e estimula a formação de EROs (ESSA, 2008).

Os danos causados pelo sal às membranas celulares, devido à peroxidação dos lipídios, podem ser representados pelo aumento dos níveis de malondialdeído (MDA).

As figuras 14A (raízes), B (caules) e C (folhas) mostram as alterações nas concentrações de MDA, quando os dois cultivares de *Vigna unguiculata* foram submetidos a (0, 25, 50, 75 e 100 mM) de NaCl.

Em raízes submetidas a 100 mM de NaCl observamos um aumento na concentração de MDA de 98,7% em Setentão e 68,52% em Pitiúba.

Nos caules, ocorreu aumento na concentração de MDA na presença de 75 mM de NaCl, para ambos os cultivares, Setentão 62,56 % e Pitiúba 118,7%.

Em folhas submetidas a 100 mM de NaCl, observou-se aumentos de 10,91% Setentão e 110,16% Pitiúba na concentração de MDA, demonstrando que os cultivares têm formas distintas de atuar para tentar minimizar o problema da peroxidação de lipídios que costuma estar associado ao estresse salino.

A diferença no padrão de aumento de concentração de MDA nos dois cultivares pode indicar que Setentão, reduz a taxa metabólica gradativamente no caule e nas folhas, com isso também reduz a peroxidação de lipídios nas células destes órgãos.

Este fato pode ser corroborado pela redução da área foliar em Setentão quando este é submetido ao NaCl. Em Pitiúba, o comportamento é oposto, havendo aumento de MDA em raízes, caules e folhas (Figura 14A, B e C). Principalmente na parte aérea,

sugerindo que a atividade metabólica se mantém mais ativa nas folhas, onde segundo Deuner *et al.* (2011) passa a ocorrer menor ação das enzimas antioxidantes. Este fato pode estar associado a maior área foliar encontrada em Pitiúba. Estes dados também sugerem que o maior estresse oxidativo em raízes se deu em Setentão e em folhas se deu em Pitiúba. Revelando que os dois cultivares apresentam diferenças nos mecanismos de defesas antioxidantes, em cada órgão da planta.

Como já mencionado, as plantas apresentam dois mecanismos básicos para adaptação aos ambientes salinos: a exclusão celular (dependente da via SOS)(BLUMWALD *et al.*, 2000) e a compartimentalização de íons nos vacúolos (dependente da NHX) (YU *et al.*, 2007; MUNNS & TESTER, 2008). A atividade do transportador SOS1 é dependente da formação do gradiente eletroquímico na membrana plasmática. A H<sup>+</sup>ATPase é responsável pela criação desse gradiente eletroquímico transportando H<sup>+</sup> do citoplasma para o meio extracelular contra um gradiente de concentração e gastando ATP. Um gradiente eletroquímico gerado na membrana vacuolar pelas atividades translocadoras de prótons da H<sup>+</sup>ATPase tipo V e Pirofosfatase (PPase) também é necessário para ativar a compartimentalização dos íons sódio através da atividade de transporte da NHX (RODRIGUEZ – ROSALES *et al.*, 2009).

No presente trabalho procurou-se identificar todos os genes das principais proteínas envolvidas no transporte de Na<sup>+</sup> relacionados com a exclusão ou compartimentalização em *V. unguiculata*. Dispondo do genoma de *Phaseolus vulgaris*, uma espécie muito próxima de *V. unguiculata*, foi possível anotar todos os genes desse genoma e, a seguir, tais genes foram usados na identificação/classificação (juntamente com os genes de *Arabidopsis*) dos respectivos fragmentos gênicos em *V. unguiculata*.

Conforme pode ser observado para as famílias multigênicas da NHX (Figura 17) e da H<sup>+</sup>ATPase do tipo P (Figura 18), para cada gene identificado em *Phaseolus vulgaris* um par ortólogo também foi identificado em *V. unguiculata*. Os números de genes para essas famílias multigênicas nas duas espécies de leguminosas (7 genes NHX e 13 H<sup>+</sup>ATPase do tipo P) foram maiores do que aqueles encontrados no genoma de *Arabidopsis* (6 genes NHX e 12 genes H<sup>+</sup>ATPase do tipo P) (Gevaudant *et al.*, 2007). Dessa forma, pode-se sugerir que pelo menos a grande maioria dos genes de proteínas envolvidas no transporte de Na<sup>+</sup> em *V. unguiculata* foi identificada e teve a expressão gênica avaliada.

Sabe-se que para uma boa confiabilidade dos dados de expressão por PCR em tempo real é imprescindível a qualidade do RNA total extraído. Nesse contexto, as

leituras de quantificação dos RNAs revelaram relações 260/280 e 260/230 entre 2,18 e 1,96 e 1,59 e 1,98 (Tabela 4), respectivamente, sugerindo que os RNAs estavam homogêneos e com pureza adequada (SAMBROOK *et al.*, 1989). Além disso, a análise das amostras em gel de agarose 1% revelou as bandas de RNAs ribossomais 18S e 28S indicando boa integridade dos RNAs (Figura 15).

Pela análise conjunta dos perfis de expressão gênica, constatou-se expressão diferenciada entre os vários genes analisados, tanto para os genes associados aos mecanismos de compartimentalização quanto para os associados aos mecanismos de exclusão, onde ficou claro que ocorreu expressão diferenciada em relação ao órgão e ao cultivar na presença de 100 mM de NaCl.

Para o funcionamento do mecanismo de exclusão dos íons sódio são necessários dois componentes, a proteína contra-transportadora SOS1 e a bomba de próton da membrana plasmática H<sup>+</sup>-ATPase tipo P, esta última codificada por uma família multigênica, onde em *Vigna unguiculata* foram detectados 13 genes.

Destes 13 genes analisados, observou-se que os genes *HATPase18*, *HATPase59*, *HATPase139* e *HATPase272*, não tiveram expressão detectada em *Vigna unguiculata* nos órgãos e nas condições estudadas, já os genes *HATPase20*, *HATPase103*, *HATPase127*, *HATPase142*, *HATPase165*, *HATPase182* e *HATPase252* foram detectados, mas não apresentaram diferenças no seu perfil de expressão, quando submetidas a 100 mM de NaCl.

Desta forma, os genes que demonstraram ter sua regulação associada ao estresse salino foram *VuHATPase 06* e *VuHATPase 48*. Sendo expressos em raízes e folhas de *Vigna unguiculata*, porém, apresentando expressão diferencial dependendo do órgão e do tratamento.

A figura 19A mostrou que *VuHATPase 06* foi expresso nas folhas dos dois cultivares, tendo sua expressão aumentada 3 vezes no cv. Setentão comparativamente a cv. Pitiúba no mesmo período de exposição ao sal (48 horas). Revelando ser um gene importante para a aclimação ao estresse salino neste cultivar.

Pitiúba não revelou mudanças significativas na expressão deste gene em folhas. Porém em raízes, o mesmo gene mostrou um comportamento diferente (Figura 19B), onde a partir de 6 horas de exposição ao sal Setentão aumentou 2 vezes sua expressão, tendo seu maior incremento na expressão neste tempo, em Pitiúba o maior aumento da expressão deste gene foi com 24 horas de contato com o sal, aumentando 4,5 em

relação ao seu controle. Este resultado indica que o gene *VuHATPase 06* é importante para os mecanismos de aclimação ao estresse salino em raízes de Pitiúba.

Em folhas, o gene *VuHATPase 48* (Figura 20A) teve um perfil de expressão semelhante ao gene *VuHATPase 06*. Em Setentão com 48 horas de exposição ao sal, ocorreu um incremento de 10 vezes na sua expressão, enquanto que, para Pitiúba nenhuma variação significativa em resposta ao sal foi observada. Para raízes (Figura 20B) o gene *HATPase 48*, não mostrou nenhuma alteração na sua expressão em Pitiúba. Porém, em Setentão ocorreu um aumento de expressão de 4 a 5 vezes a partir de 6 horas de exposição ao sal.

Foi observado, que nas raízes dos dois cultivares Setentão e Pitiúba ocorre um incremento na expressão dos genes codificadores para as bombas geradoras do gradiente eletroquímico de prótons na presença de 100 mM de NaCl. Este gradiente se faz necessário para a ativação dos mecanismos de transporte ativo presentes na membrana plasmática (ARANGO *et al.*, 2003), dentre os transportadores que dependem deste gradiente temos a proteína SOS1 (ALEXANDERSSON *et al.*, 2004; BLUMWALD, 2000). No entanto, este gradiente está também associado a outros mecanismos de transporte para outros íons como o K<sup>+</sup> (PIZZARO, 2010; QUINTERO *et al.*, 2011; VITART *et al.*, 2001; LUO *et al.*, 1999; ARANGO *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2007), o que explica, que o aumento da expressão da próton ATPase de membrana não necessariamente segue o aumento da mesma magnitude na expressão do gene SOS1 como o que ocorreu em raízes de Setentão, onde apesar do aumento da expressão das bombas de prótons da membrana plasmática ocorreu um aumento menor na expressão deste transportador. O aumento da expressão isolada destas bombas de prótons é insuficiente para caracterizar aumento na atividade de exclusão do Na<sup>+</sup> (HASEGAWA *et al.*, 2000).

Em folhas de Pitiuba observou-se não ocorrer um grande aumento na expressão das bombas de prótons da membrana plasmática, em oposição a Setentão, onde ocorreu tanto o aumento na expressão das de prótons da membrana plasmática quanto da SOS1, o que pode estar associado a um aumento na exclusão citoplasmática de sódio para o apoplasto celular (SHI *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2002; SONDERGAARD *et al.*, 2004). Em Pitiúba, mesmo sem o aumento na expressão das bombas de prótons observou-se um aumento na expressão da SOS1.

A análise da expressão do gene *SOS1* revelou que este gene é expresso em raízes e folhas de *Vigna unguiculata*. Contudo, apresenta expressão diferencial

dependendo do órgão e do tratamento (Figuras: 22A e B). As maiores expressões foram observadas em raízes de Pitiúba e folhas de Setentão. Em todos os órgãos o NaCl ocasionou aumentos na expressão, exceto nas folhas de Pitiúba. Resultados semelhantes foram encontrados por Tang *et al.*, (2010) estudando Poplar em condições de estresse salino.

Em relação ao mecanismo de compartimentalização podemos dividi-lo na ação do transportador de Na<sup>+</sup> para o interior do vacúolo (NHX) e na ação das bombas de prótons vacuolares (Pirofosfatases e H<sup>+</sup>-ATPases tipo V).

Em *Vigna unguiculata* foram detectadas sete isoformas de genes que codificam as NHX, sendo que destas *NHX3*, *NHX4a* e *NHX4b*, não tiveram expressão detectada, Os genes *NHX5* e *NHX6* foram detectados, mas não apresentaram diferenças no seu perfil de expressão quando submetidas a 100 mM de NaCl.

As isoformas *NHX1* e *NHX2*, apresentaram diferenças no perfil de expressão na presença e ausência de 100 mM de NaCl e em relação ao cultivar. A análise de expressão por qPCR mostrou que os genes *NHX 1* e *NHX 2* são mais expressos em raízes que folhas de *Vigna unguiculata*.

A figura 24A mostrou que a *NHX1* apenas sofreu alteração significativa na expressão no tempo 48 horas de exposição ao sal em folhas do cultivar Pitiúba. A análise da expressão do gene *NHX1* nas raízes (Figura 24B) revelou que o sal teve sua principal interferência em Pitiuba nos tempos 12 e 24 horas causando um aumento na expressão na ordem de 7 e 4,5 vezes respectivamente. Por outro lado, no cultivar Setentão, o sal não causou alteração significativa no padrão de expressão em ambos os tecidos, folhas e raízes. Este fato sugere, que em Setentão o gene *NHX1* não está correlacionado aos mecanismos de aclimação ao estresse salino.

A análise de expressão do gene *NHX2* em folhas (Figura 25A) revelou que a presença do sal inibiu sua expressão em Pitiúba e aumentou em Setentão, tendo seu aumento máximo no tempo 48 horas. Estes dados indicam que o gene *NHX2* é o importante para os mecanismos de aclimação ao estresse salino em Setentão. Já que a análise da expressão do gene *NHX1*, não revelou sua associação aos mecanismos de aclimação ao estresse salino em Setentão.

Em raízes, (Figura 25B) a expressão de *NHX2* em Pitiúba, também não revelou alguma relação com o estresse salino. Porém, em Setentão o sal induziu um aumento de 19 e 18 vezes na expressão nos tempos 6 e 12 horas, respectivamente. Os dados indicam que as duas NHX são muito mais expressas em raízes do que em folhas. Li *et*

*al.*, (2008) mostraram que o teor de transcrito do *NHX1* aumentou em diferentes concentrações de NaCl, sendo este aumento mais notável na presença de 400 mM NaCl. Sotossanto *et al.*, (2007) observou que o estresse salino aumentou a expressão dos genes *AtNHX1* e *AtNHX2* em plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Foi observado por Zahran *et al.*, (2007) que o padrão de expressão dessa família multigênica NHX é diferente em folhas e raízes e também em relação a concentração de NaCl, quando este estudou leguminosas. Esses resultados são semelhantes aos encontrados em *V. unguiculata* quando foi observado um maior padrão de expressão para o *VuNHX2* (Figura 25A e B), Ye *et al.*, (2009) mostraram que a expressão dos genes *NHX1-6* em raízes, caules e folhas de *Populus euphratica* aumentou quando submetidos à elevada concentração de NaCl por seis horas. Estes dados mostram a importância dos contra-transportadores em plantas submetidas ao estresse salino.

No tocante as bombas de prótons vacuolares, estudou-se o perfil de expressão das duas pirofosfatases *Ppase1* e *Ppase2*, onde foi percebido que 100 mM de NaCl não causou alterações no perfil de expressão do gene *Ppase2*. Para o gene *Ppase1* a qPCR revelou que ele é expresso em raízes de *Vigna unguiculata*, uma vez que foi induzido em ambos os cultivares (Figuras: 23B). O perfil de expressão do gene *Ppase1* em raízes revelou picos de expressão principalmente nos tempos 6 e 12 horas de exposição ao sal em ambas as cultivares.

Oliveira (2007) e Sobreira (2009) encontraram resultados semelhantes estudando as bombas de prótons de feijão-de-corda submetido ao estresse salino, onde foi observado que em plantas jovens as principais bombas de prótons vacuolares são as pirofosfatases (TESTER *et al.*, 2003), dados estes que corroboram com resultados aqui obtidos, visto que as plantas estudadas tinham 12 dias após a semeadura. Como nas raízes ocorreram os maiores incrementos na expressão das NHX, logo, faz sentido que estes aumentos sejam seguidos de um aumento na expressão das pirofosfatases, visto que elas atuam como bombas energizadoras destes transportadores de Na<sup>+</sup> (YOKOI *et al.*, 2002; ZHU *et al.*, 2002).

As outras bombas de prótons vacuolares são as H<sup>+</sup>-ATPases tipo V. Nesse trabalho foi encontrado apenas um gene codificador para o gene da *V-ATPase subA* (subunidade catalítica) através de pesquisa *in silico* tanto em *V. unguiculata* (*VuATPase subA*) como em *P. vulgaris* (*PvATPase subA*).

A figura 21A mostra que o gene *VuATPase subA* foi induzido em folhas de Setentão, onde se observou um aumento de 1,5 vezes na sua expressão no tempo 48

horas. Já em folhas de Pitiúba a exposição ao sal não causou aumento na expressão. Fukuda *et al.*, (2004) encontraram resultados diferentes quando estudaram o nível de transcrito da subunidade A da V-ATPase (*HvVHA sub A*) de raízes de cevada submetidas a 200 mM NaCl. Janicka-Russak (2007) mostrou que a expressão do V-ATPase sub A de tonoplastos em raízes de pepino aumentou após tratamento com NaCl em relação ao controle, porém, estes dados foram obtidos com plantas com idades superiores as utilizadas em nossos experimentos.

A análise da expressão gênica de proteínas envolvidas no transporte de Na<sup>+</sup> em ambos os cultivares possibilitou traçar um cenário sobre a regulação das vias de exclusão celular e ou compartimentalização do Na<sup>+</sup> no vacúolo (Figura 26). Assim sendo, a regulação da exclusão celular de Na<sup>+</sup> foi inferida através da análise dos níveis de transcritos do contra-transportador de membrana plasmática *VuSOS1* e das H<sup>+</sup>-ATPase tipo P (*VuHATPase 06* e *VuHATPase 48*).

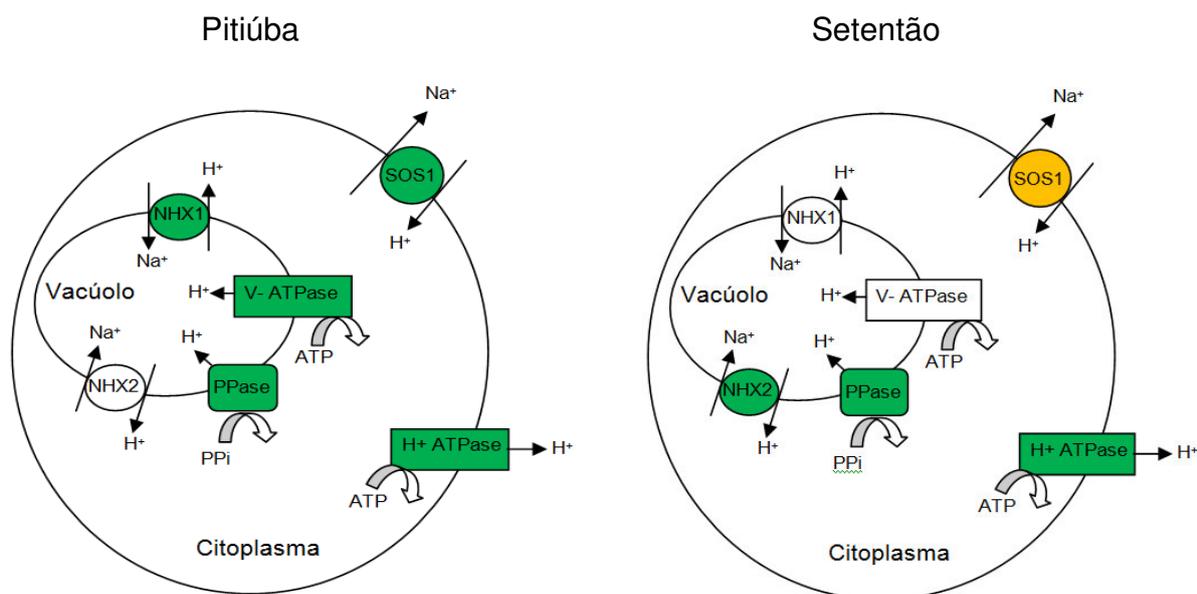
Já a compartimentalização do Na<sup>+</sup> no vacúolo foi inferida pela expressão dos genes dos contra-transportadores vacuolares (*NHX1* e *NHX2*), da subunidade A (catalítica) da H<sup>+</sup>-ATPase tipo V e da V-Ppase (*VuPpase1*).

Pela análise conjunta dos dados de expressão (Figura 26) foi possível sugerir que nos dois cultivares de *Vigna unguiculata*, Pitiúba e Setentão os dois mecanismos de aclimação a salinidade: compartimentalização e exclusão do sódio, são utilizados de formas distintas nos diferentes órgãos estudados/cultivares.

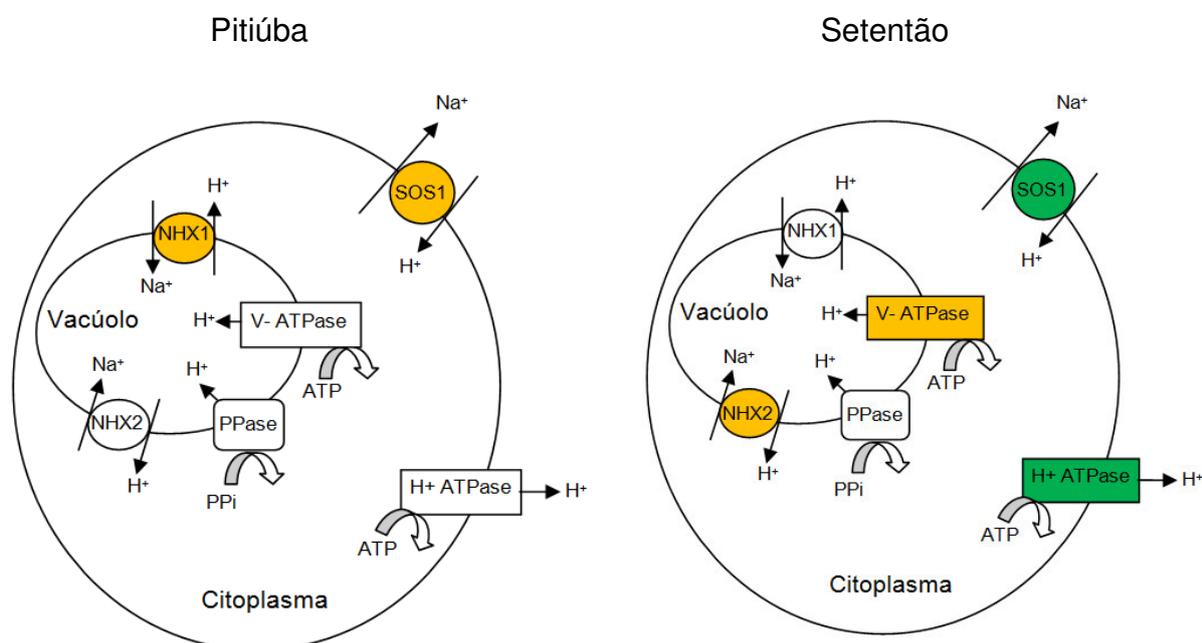
Em Pitiúba, a análise da expressão gênica indicou que a raiz é o órgão mais importante na regulação da sua capacidade de adaptação ao estresse salino, onde ocorreu maior expressão dos genes *VuHATPase 06*, *VuSOS1*, *Ppase1*, V-ATPase subA e *NHX1*.

Em Setentão, observou-se que o mecanismo de exclusão em raízes foi menos ativo do que em Pitiuba. Porém, em folhas esse mecanismo foi mais ativo. Outra diferença importante entre os dois cultivares foi em relação ao mecanismo de compartimentalização de Na<sup>+</sup>. Enquanto que em Pitiúba esse mecanismo de compartimentalização foi induzido através da *NHX1*, em Setentão foi por meio da *NHX2*, em ambos os tecidos raízes e folhas. Em ambos os cultivares, a compartimentalização de Na<sup>+</sup>, a exemplo da exclusão, parece ter ocorrido mais intensamente nas raízes do que em folhas.

## RAÍZES



## FOLHAS



**Figura 26:** Esquema representativo da média da expressão dos genes de proteínas envolvidas na exclusão celular (**SOS1** e **H<sup>+</sup>ATPase**) ou compartimentalização vacuolar de  $Na^+$  (**NHX**, **V-ATPase**, **PPase**). Raízes e Folhas. Os genes de proteínas que tiveram a expressão aumentada em resposta ao NaCl em até duas vezes aparecem na cor laranja, acima de duas vezes aparecem na cor verde (elaboração do autor).

Então, como já mencionado, nas folhas de Setentão o mecanismo de exclusão provavelmente é mais ativo do que em Pitiúba. Entretanto, a exclusão de sódio na parte aérea em plantas não halófitas não é vantajosa, pois pode acarretar em acúmulo de  $\text{Na}^+$  apoplástico (TAIZ & ZEIGER, 2013; TESTER & DAVENPORT, 2003) agravando o problema do estresse osmótico associado ao estresse salino, levando à redução da quantidade de água metabolicamente ativa e, por conseguinte, a redução da taxa metabólica e do crescimento. De fato, esse cenário é coerente com as mudanças fisiológicas observadas em Setentão o qual apresentou uma menor área foliar e maior perda de turgor quando em contato com o NaCl (Figura 5A, B, C e D).

Sabe-se que as pirofosfatases complementam a atividade da  $\text{H}^+$ -ATPases tipo V que mantém o aumento da atividade de bombeamento de prótons vacuolar total mediado pelo sal (FUKUDA *et al.*, 2004). Portanto, ambas as bombas atuando conjuntamente são importantes mecanismos para promover a tolerância ao sal e o ajustamento osmótico, dado que, elas produzem um gradiente de prótons que dirige a força para o contra-transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  assim como outros transportadores de membrana. Isto é reforçado dado que plantas que super-expressam o gene da pirofosfatase aumentam a tolerância ao sal e seca (GAXIOLA *et al.*, 2001; SOBREIRA, 2009). Comparando-se a expressão das bombas de prótons vacuolares nas duas cultivares observou-se que as pirofosfatases foram as que tiveram seus genes mais expressos, indicando que estas devem ser as principais bombas envolvidas na geração do gradiente eletroquímico em vacúolos nas plantas com 12 dias após a semeadura.

## 7 CONCLUSÕES

Os parâmetros tais como: aspectos visuais, área foliar e razão  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dão suporte para que Pitiúba seja classificada como um cultivar mais tolerante ao estresse salino do que Setentão. Os parâmetros, crescimento e percentual de água não foram conclusivos.

O cultivar Pitiúba apresentou uma concentração constitutiva de prolina maior do que em Setentão sugerindo-se, portanto, uma pré-aclimatação para tolerar o estresse salino.

*Vigna unguiculata* apresenta pelo menos 1 gene *SOS1*, 13 genes *H<sup>+</sup>-ATPase* tipo P, 7 genes *NHX*, 2 genes *PPase* e 1 gene *V-ATPase subA*. Desses genes, *SOS1*, *H<sup>+</sup>-ATPase 06* e *48*, *NHX1*, *NHX2*, *PPase1* e *V-ATPase subA* foram induzidos em resposta ao estresse salino.

Os cultivares Pitiúba e Setentão usam diferentes estratégias de exclusão celular ou compartimentalização vacuolar do  $\text{Na}^+$  em raízes e folhas.

A exclusão de  $\text{Na}^+$  em Pitiúba ocorreu principalmente nas raízes, enquanto que em Setentão mais intensamente nas folhas.

A compartimentalização vacuolar do  $\text{Na}^+$  foi mais intensa nas raízes de ambos os cultivares, contudo, pelo aumento da expressão de genes diferentes em Pitiúba *NHX1* e em Setentão *NHX2*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, P. K.; SHUKLA, P. S.; GUPTA, K.; JHA, B. Bioengineering for Salinity Tolerance in Plants: State of the Art, **Mol Biotechnol** v. 54, p. 102–123, 2013.

AGEITEC

<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/coco/arvore/CONT000gl5m1ff702wx5ok0xkgyq5mt1fmml.html>

Acesso em 03/05/2013

ALEXANDERSSON, E.; SALBACH, G.; LARSSON, C.; KJELLBOM, P. *Arabidopsis* plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking, **Plant Cell Physiol.** v.45, p.1543–1556, 2004.

ALONSO, R. N.; RUBIO, F. High-affinity potassium and sodium transport systems in Plants, **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 5, p. 1149–1160, 2006

ALSTERFJORD, M.; SEHNKE, P. C.; ARKELL, A.; LARSSON, H.; SVENNELID, F.; ROSENQUIST, M.; FERL, R. J.; SOMMARIN, M.; LARSSON, C.; Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and 14-3-3 isoforms of *Arabidopsis* leaves: evidence for isoform specificity in the 14-3-3/H<sup>+</sup>-ATPase interaction, **Plant Cell Physiol.** v. 45, p. 1202–1210, 2004.

APSEA, M. P. & BLUMWARD, E. Na<sup>+</sup> transport in plants, **FEBS Letters.** v. 581, p. 2247–2254, 2007.

ARANGO, M.; GEVAUDANT, F.; OUFATTOLE, M.; BOUTRY, M.; The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. **Planta** v. 216, p. 355–365, 2003.

ARRUDA, K. R.; SMIDERLE, O. J.; VILARINHO, A. A. Uniformidade de sementes de genótipos de feijão-caupi cultivados em dois ambientes no Estado de Roraima. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 3, n. 2, p. 122-127, 2009.

ASHLEY, M. K.; GRANT, M.; GRABOV, A. Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. **Journal of Experimental Botany**. v. 57, n. 2, p. 425-436, 2006.

ASSIS JÚNIOR, J. O.; LACERDA, C. F.; DA SILVA, F.; SILVA, F. L.; BEZERRA, M. A.; GHEYI, H. R.; Produtividade do feijão-de-corda e acúmulo de sais no solo em função da fração de lixiviação e da salinidade da água de irrigação. **Eng. Agríc.** v. 27. n. 3, 2007.

BALLESTEROS, E.; DONAIRE, J. P.; BELVER, A. Effects of salt stress on H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase activities of tonoplast-enriched vesicles from sunflower roots. **Physiologia Plantarum**, v. 97, p. 259–268, 1996.

BHANDAL I. S.; MALIK C. P. Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. **International Review of Cytology**. v. 110, p. 205-254, 1998.

BARKLA B. J., PANTOJA O. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. **Plant Physiol.** v. 47, p. 159 – 184, 1996.

BATES, L. S., Rapid Determination of free Proline for water-stress studies. **Plant and soil**, v. 39, p. 205-207. 1973.

BAXTER, I. R.; YOUNG, J. C.; ARMSTRONG, G.; FOSTER, N.; PEER, W. A.; MURPHY, A. S.; HARPER, J. F.; A plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase is required for the formation of proanthocyanidins in the seed coat endothelium of *Arabidopsis thaliana*, **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 7, p. 2649–2654, 2005.

BELTRÃO JUNIOR, J. A.; CRUZ, J. S.; SOUSA, E. C.; SILVA, L. A. Rendimento do feijão caupí adubado com diferentes doses de biofertilizante orgânico produzido através da biodegradação acelerada de resíduos de coqueiro no município de Trairí-CE. **IRRIGA, Brazilian Journal of Irrigation and Drainage**, v. 1, n. 1, 2012.

BERTINI, C. H. C. M.; ALMEIDA, W. S.; SILVA, A. P. M.; LIMA E SILVA, J. W.; TEOFILO, E. M. Análise multivariada e índice de seleção na identificação de genótipos superiores de feijão-caupi. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 4, p. 613-619, 2010.

BINZEL, M.; HASEGAWA, P. M.; RHODES, D. Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. **Plant Physiol.** v. 84, p. 1408 -1415, 1987.

BLADE, S. F.; SHETTY, S. V. R.; TERAPO, T.; SINGH, B. B. Recent developments in cowpea cropping systems research. In: eds. **B.B. Singh and M. Raj**, Advances in Cowpea Research, 1997.

BLUMWALD, E. Sodium transport and salt tolerance in plants. **Curr Opin Cell Biol**, v. 12, p. 431–4, 2000.

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

BOURSIAC, Y.; CHEN, S.; LUU, D. T., SORIEUL M.; DRIES, N. V. & MAUREL C. Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. **Plant Physiology**, v. 139, p. 790–805, 2005.

BRESSANI, R. Nutritive value of cowpea. In: eds. **S.R. Singhand K.O. Rachie**, Cowpea Research. New York, p. 353-359, 1985.

BRISKIN, D. P.; REYNOLDS-NIESMAN, I. Change in target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase during solubilization and reconstitution. **Plant Physiol** v. 90, p. 394–397, 1989.

BUCH-PEDERSEN, M. J.; RUDASHEVSKAYA, E. L.; BERNER, T. S.; VENEMA, K.; PALMGREN, M. G.; Potassium as an intrinsic uncoupler of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. **J Biol Chem**, v. 281, p.38285–38292, 2006.

BUKRINSKY, J. T.; BUCH-PEDERSEN M. J.; LARSEN, S.; PALMGREN, M. G. A putative proton binding site of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase identified through homology modelling. **FEBS Letters** v. 494, p. 6–10, 2001.

CAKMAK, I. & HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v. 83, p. 463–468, 1991.

CASTRO, C. R. T. & GARCIA, R. Competition among plants for the light recourse. **Ciênc. Rural**. v. 26, n. 1, p. 167-174, 1996.

CAVALCANTE, L. F. *et al.* Fontes e níveis da salinidade da água na formação de mudas de mamoeiro cv. Sunrise. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 1281- 1290, 2010.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, S. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant, **Funct. Plant Biol.** v. 30, p. 239-264, 2003.

CHAVES, M. M.; PEREIRA, S.; MAROCO, J. P.; RODRIGUES, M. C.; RICARDO, C. P. P.; OSORIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIAS, T.; PINHEIRO, C. How plant cope with water stress in the field. **Photosynthesis and Growth. Ann. Bot.** v. 89, p. 907-916, 2002.

CHEN, Z. H.; HILLS, A.; BAETZ, U.; AMTMANN, A.; LEW, V. L.; BLATT, M. R. Systems dynamic modeling of the stomatal guard cell predicts emergent behaviors in transport, signaling, and volume control. **Plant Physiol.** v. 159, p. 1235–51, 2012.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance. **Genetic Engineering**. v. 27, p. 141–177, 2006.

CHOI, W., *et al.* NKS1, Na(+)- and K(+)-sensitive 1, regulates ion homeostasis in an SOS-independent pathway in Arabidopsis. **Phytochemistry**. v.72, n. 4, p. 330-336, 2011.

CHRISPEELS, M. J.; CRAWFORD, N. M.; SCHROEDER, J. I. Proteins for transport of Water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. **The Plant Cell**, v. 11, p. 661-675, 1999.

CONAB, 2012

[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_04\\_16\\_13\\_38\\_04\\_conjuntura\\_sobre\\_producao\\_de\\_feijao\\_no\\_ceara\\_safra\\_2011\\_2012.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_16_13_38_04_conjuntura_sobre_producao_de_feijao_no_ceara_safra_2011_2012.pdf)

Acesso em 07/01/2014

CONUS, L. A.; CARDOSO, P. C.; VENTUROSOS, L. R.; SCALON, S. P. Q. Germinação de Sementes e Vigor de plântulas de milho submetidas ao estresse salino induzido por diferentes sais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 4, p. 67-74, 2009.

COSTA, P.H.A.; SILVA, J.V.; BEZERRA, M.A.; FILHO, J.E.; PRISCO, J.T.; GOMES FILHO, E.; Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em cultivares de *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. **Revista Brasil. Bot.**, v. 26, n. 3, p. 289-297, 2003.

CRUZ, G. A. D. R.; OLIVEIRA, M. G. A.; COSTA, N. M. B.; PIRES, C. V.; CRUZ, M. A.; MOREIRA, M. A. Comparação entre a digestibilidade *in vitro* e *in vivo* de diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*) armazenados por 30 dias. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n. 3, 2005.

DIAS, N. D. & BLANCO, F. F. Efeitos dos sais no solo e na planta. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. Manejo da salinidade na agricultura: **Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade. p. 129-140, 2010.

DAVIS, D. W.; MARSH, D. B.; ALVAREZ, M. N. Cowpea breeding lines. **Hort. Sci.** v. 21, p. 1080-1081, 1986.

DEUNER, C.; MAIA, M. S.; DEUNER, S.; ALMEIDA, A. S.; MENEGHELL, G. E. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo

submetidos ao estresse salino. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 33, n 4, p. 711 - 720, 2011.

DEWITT, N. D.; HARPER, J. F.; SUSSMAN, M. R. Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants, *Plant J.* v.1, p. 121–128, 1991.

D'ONOFRIO, C. & LINDBERG, S. Sodium induces simultaneous changes in cytosolic calcium and pH in salt-tolerant quince protoplasts. *Journal of Plant Physiology*. v. 166, p. 1755–1763, 2009.

DUBY, G. & BOUTRY, M. The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflugers Arch.* v. 457, n. 3, p. 645-655, 2009.

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

EKBERG, K.; PALMGREN, M. G.; VEIERSKOV, B.; BUCH-PEDERSEN, M. J. A Novel Mechanism of P-type ATPase Autoinhibition Involving Both Termini of the Protein. *J. Biol. Chem.* v. 285, p. 7344-7350, 2010.

ELOWAD, H. O. A.; HALL, A. E. Influences of early and late nitrogen fertilization on yield and nitrogen fixation of cowpea under well-watered and dry field conditions. *Field Crops Res.*, v. 15, p. 229-244, 1987.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Pragas e doenças do Feijão.

Disponível em:<<http://www.cnpaf.embrapa.br>>.

Acesso em: 14/07/2012.

EPSTEIN, E. & BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Editora Planta. p. 403, 2006.

- ESSA, T. A. Effect of salinity stress on growth and nutrient composition of three soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars. **Journal of Agronomy Crop Science**, v. 188, p. 86-93, 2008.
- ESTEVEZ, B. S. & SUZUKI, M. S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecol Bras.** v. 12, n. 4, p. 662-679, 2008.
- FARIAS, S. G. G. *et al.* Estresse salino no crescimento inicial e nutrição mineral de Gliricídia (*Gliricidia sepium* (Jacq.)) em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1499-1505, 2009.
- FERNANDES DE MELO, D.; ARAGÃO, M. E. F.; GUEDES, M. M.; OTOCH, M. L. O.; FLORINDO, M. I.; LIMA, M. G. S. Differential responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activities of two *Vigna unguiculata* cultivars to salt stress. **Braz. J. Plant Physiol.** v. 17, n. 2, 2005.
- FERREIRA, P. A. Manejo de água-plantas em solos salinos. **Curso de Pós-graduação em Engenharia Agrícola**. Viçosa: UFV, p. 93, 1998.
- FERY, R. L. Development of improved southern pea varieties for the southern United States: an update on the USA effort. **Vegetable Association Yearbook**. p. 53, 2002.
- FLOWERS, T. J.; TROKE, P. F.; YEO, A. R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. **Annu. Rev Plant Physiol.** v. 28, p. 89-21, 1977.
- FLOWERS, T. J. & LÄUCHLI, A. Sodium versus potassium: substitution and compartmentation. **Inorganic Plant Nutrition**. v. 15b, p. 651-681, 1983.
- FLOWERS, T.J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 307-319, 2004.
- FRAILE-ESCANCIANO, A. *et al.* The SOS1 transporter of *Physcomitrella patens* mediates sodium efflux in plants. **New Phytol.** v. 188(3), p.750-761, 2010.

FREIRE FILHO, F. R. F.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, C. A. F. Melhoramento genético de Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região do Nordeste. **Melhoramento do Caupi**. Capítulo em livro técnico-científico, EMBRAPA Meio-Norte ED. 1999.

FUKUDA, A.; NAKAMURA, A.; TAGIRI, A.; TANAKA, H.; MIYAO, A.; HIROCHIKA, H.; TANAKA, Y. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from rice. **Plant Cell Physiol**, v. 45, p. 149–159, 2004.

GASPER, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J. F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures, **Plant Growth Regul.** v. 37, p. 263–285, 2002.

GAXIOLA, R. A.; LI, J.; UNDURRAGA, S.; DANG, L. M.; ALLEN, G. J.; ALPER, S. L.; FINK, G. R. Drought- and salt-tolerance plants result from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 98, p. 18830-18835, 2001.

GAXIOLA, R. A.; PALMGREN, M. G.; SCHUMACHER, K. Plant proton pumps. **FEBS Letters**. v. 25, n. 581, p. 2204-2214, 2007.

GEVAUDANT, F.; DUBY, G.; VON STEDINGK, E.; ZHAO, R.; MORSOMME, P.; BOUTRY, M. Expression of a constitutively activated plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase alters plant development and increases salt tolerance. **Plant Physiol**. v. 144, p. 1763–1776, 2007.

GORHAM, J.; WYN, J. R. G. & MCDONNELL E. Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. **Plant and Soil**, v. 89, p. 15–40, 1985.

GOORMAGHTIGH, E.; CHADWICK, C.; SCARBOROUGH, G. A.; Monomers of the *Neurospora* plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase catalyze efficient proton translocation. **J Biol Chem**. v. 261, p. 7466–7471, 1986.

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

GUPTA, B. & HUANG, B. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization **International Journal of Genomics**, v. 11, p. 18-25, 2014.

GUO, Y.; HALFTER, U.; ISHITANI, M.; ZHU, J. K.; Molecular characterization of functional domains in the protein SOS2 that is required for plant salt tolerance. **Plant Cell.** v. 13, p. 1383–400, 2001.

GUO, W. Z., WANG, W., ZHOU, B. L., ZHANG, T. Z. Cross-species transferability of *G. arboreum*-derived EST-SSRs in the diploid species of *Gossypium*. **Theor Appl Genet**, v.112, p. 1573–1581, 2006.

HADIARTO, T.; LAM-SON, P. T. Progress studies of drought-responsive genes in rice. **Plant Cell.** v. 30, p. 297–310, 2011.

HAGER, A.; DEBUS, G.; STRANSKY, H.; SERRANO, R. Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, **Planta.** v. 185, p. 527–537, 1991.

HALFTER, U.; ISHITANI, M.; ZHU, J. K. The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 97, p. 730–734, 2000.

HALL, A. E.; PATEL, P. N. Breeding for resistance to drought and heat. In: eds. S.R. Singh and K.O. Rachie, **Cowpea Research, Production and Utilization**. Wiley, New York, p. 137-151, 1985.

HANSTEIN, S.; WANG, X.; QIAN, X.; FRIEDHOFF, P.; SHAN, Y.; FENG, K.; SCHUBERT, S. Changes in cytosolic Mg<sup>2+</sup> levels can regulate the activity of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in maize. **Biochem J.** v. 435, n. 1, p. 93-101, 2011.

HARO, R.; BARUELOS, M. A.; NAVARRO, R. High-affinity sodium uptake in land plants. **Plant Cell Physiol.** v. 51, n. 1, p. 68–79, 2010.

HAUSER, F. & HORIE, T. A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K/Na ratio in leaves during salinity stress, **Plant Cell and Environment.** v. 33, p. 552–565, 2010.

HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 51, p. 463–499, 2000.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The Water culture methods of growing plants without soil, **Calif. Agric. Exp. STn. Circ.** University of California, Berkeley, p. 347, 1950.

HOPKINS, G. W. Introduction to plant physiology. **John Wiley e Sons**, New York, 1999.

HU, Y. C.; SHAO, H. B.; CHU, L. Y.; WU, G. Relationship between water use efficiency (WUE) and production of different wheat genotypes at soil water deficit, **Colloids Surf. Biointerf.** v. 53, p. 271–277, 2006.

HUBICK, K.T.; FARQUHAR, G.D.; SHORTER, R.; Correlation between water use efficiency and carbon isotope discrimination in diverse peanut germplasm, **Aust. J. Plant Physiol.** v.13, p. 803–814, 1986.

IPECE, 2014

[http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/enfoqueeconomico/EnfoqueEconomicoN97\\_15\\_01\\_2014.pdf](http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/enfoqueeconomico/EnfoqueEconomicoN97_15_01_2014.pdf)

Acesso em 19/01/2014

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

ISHITANI, M.; LIU, J.; HALFTER, U.; KIM, C. S.; WEI, M.; ZHU, J. K.; SOS3 function in plant salt tolerance requires myristoylation and calcium-binding. **Plant Cell**. v.12, p.1667–1677, 2000.

JANICKA-RUSSAK M., KLOBUS G. Modification of plasma membrane and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in response to NaCl and ABA. **Journal of Plant Physiology** v.164, p. 295-302, 2007.

KANCZEWSKA, J.; MARCO, S.; VANDERMEEREN, C.; MAUDOUX, O.; RIGAUD, J. L.; BOUTRY, M. Activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation and binding of 14–3–3 proteins converts a dimer into a hexamer. **Proc Natl Acad Sci U S A** v. 102, p. 11675–11680, 2005.

KANDPAL, R. P.; RAO, N. A. Water stress induced alterations in the properties of ornithine aminotransferase from ragi (*Eleusine coracana*) leaves. **Biochemistry International**, Marvickville, v. 5, p. 297-302, 1982.

KHAN, M. A.; UNGAR, I. A.; SHOWALTER, A. M. Effects of salinity on growth, ion content and osmotic relations in *Halopyrum mocoronatum* (L.) Stapf. **Journal of Plant Nutrition**. v. 22, p. 191-204, 1999.

KIYOSUE, T.; YOSHIBA, Y.; YAMAGUCHI- SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase: an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but down regulated by dehydration in Arabidosis. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1323-1335, 1996.

KINOSHITA, T.; SHIMAZAKI, K. Biochemical evidence for the requirement of 14–3–3 protein binding in activation of the guard-cell plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by blue light. **Plant Cell Physiol**. v. 43, p. 1359–1365, 2002.

KINOSHITA, T.; SHIMAZAKI, K. Blue light activates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. **EMBO J.** v. 18, p. 5548–5558, 1999.

KNIGHT, H.; TREWAVAS, A. J.; KNIGHT, M. R. Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. **Plant J.** v. 12, p. 1067–1078, 1997.

KWAPATA, M. B.; HALL, A. E. Effects of moisture regime and phosphorus on mycorrhizal infection, nutrient uptake, and growth of cowpeas (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Field Crops Res.** v. 12, p. 241-250, 1985.

LAUCHLI, A.; JAMES, R. A.; HUANG, C. X.; MCCULLY, M.; MUNNS, R. Cell-specific localization of Na<sup>+</sup> in roots of durum wheat and possible control points for salt exclusion. **Plant, Cell and Environment.** v. 31, p. 1565–1574, 2008.

LEFEBVRE, B.; BATOKO, H.; DUBY, G.; BOUTRY, M. Targeting of a *Nicotiana plumbaginifolia* H<sup>+</sup>-ATPase to the plasma membrane is not by default and requires cytosolic structural determinants. **Plant Cell.** v. 16, p. 1772–1789, 2004.

LEWIS, G.; SCHIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the world: Population differences in water use efficiency of *Eucalyptus microtheca* seedling under different watering regimes, **Physiol. Plant,** v. 108, p. 134–139, 2005.

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

LI, J-L.; HE, X-W.; XU, L., ZHOU, J.; WU, P.; SHOU, H-X.; ZHANG, F-C. Molecular and comparisons of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers originated from glycophytic and halophytic species. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B.** v. 9, p. 132-140, 2008.

- LIVAK, K. J. & SCHMITTEN, T. D. Analysis of gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**. v. 25, p. 402-408, 2001.
- LIU, J.; ZHU, J. K. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. **Science**. v.280, p.1943–1945, 1998.
- LOBATO, A. K. S.; FILHO, B. G.; SANTOS; COSTA, R. C. L.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; MORAES, E. C.; OLIVEIRA NETO, C. F.; RODRIGUES, V. L. F.; CRUZ, F. J. R.; FERREIRA, A. S.; PITA, J. D.; BARRETO, A. G. T. Morphological, Physiological and Biochemical Responses During Germination of the Cowpea (*Vigna unguiculata* Cv.Pitiuba) Seeds under Salt Stress. **World Journal of Agricultural Sciences**. v. 5, n. 5, p. 590-596, 2009.
- LONE, M. L.; KUEH, J. S. H.; JONES, R. G.W. Influence of proline and glycinebetaine on salt tolerance of cultured barley embryos. **J. Expt. Bot.** v. 38, p. 470 - 490, 1987.
- LOPES, J. C. & MACEDO, C. M. P. Germinação de sementes de couve chinesa sob influência do teor de água, substrato e estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 3, p. 079-085, 2008.
- LÜTTGE, U. & RATAJCZAK, R. The physiology, biochemistry and molecular biology of the plant vacuolar ATPase. **Adv. Bot. Res.** v. 25, p. 253 – 296, 1997.
- LUO, H.; MORSOMME, P.; BOUTRY, M. The two major types of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases show different enzymatic properties and confer differential pH sensitivity of yeast growth, **Plant Physiol.** v.119, p. 627–634, 1999.
- MAATHUIS, F. J.; FILATOV, V.; HERZYK, P.; KRIJGER, G. C.; AXELSEN, K. B.; CHEN, S.; GREEN, B. J.; LI, Y.; MADAGAN, K. L.; SANCHEZ-FERNANDEZ, R. Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress, **Plant J.** v. 35, p. 675–692, 2003.

MAATHUIS, F.; SANDERS, D. Sodium uptake in Arabidopsis roots is regulated by cyclic nucleotides. **Plant Physiol** v. 89, p. 1348 -1355, 2001.

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

MARINHO, F. J. L.; GHEYI, H. R.; FERNANDES, P. D.; HOLANDA, J. S.; NETO, F. N. Cultivo de coco Anão Verde irrigado com águas salinas. **Pesq. agropec. bras.** v. 41, n. 8, p. 1277-1284, 2006.

MARSHALL, O. J. Perlprimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics**, v.12, n. 20, p. 2471-2, 2011.

MARTINOIA, E.; MAESHIMA, M.; NEUHAUS, E. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. **Journal of Experimental Botany**. v. 58, p. 83-102, 2007.

MARUYAMA, T.; NIITA, K.; OYAMATSUK.; MARUYAMA, T.; CHIBA, S.; IWAMOTO, A. Quantum molecular dynamics approach to the nuclear matter below the saturation density. **Physical Review C**. v. 57, p. 657-665, 1998.

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.

MELONI, D. A.; GULOTTA, M. R.; MARTÍNEZ, C. A.; OLIVA, M. A. The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycine betaine accumulation in *Prosopis alba*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 16, p. 39-46, 2004.

MERLOT, S.; LEONHARDT, N.; FENZI, F.; VALON, C.; COSTA, M.; ETTE, L.; VASSEUR, A.; GENTY, B.; BOIVIN, K.; MULLER, A.; GIRAUDAT, J.; LEUNG, J. Constitutive activation of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase prevents abscisic acid mediated stomatal closure. **EMBO J**. v. 26, p. 3216–3226, 2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA

<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>

Acesso em 06/01/2014

MITO, N.; WIMMERS, L. E.; BENNETT, A. B. Sugar regulates mRNA abundance of H<sup>+</sup>-ATPase gene family members in tomato, **Plant Physiol.** v. 112, p. 1229–1236, 1996.

MORSOMME, P.; CHAMI, M.; MARCO, S.; NADER, J.; KETCHUM, K. A.; GOFFEAU, A.; RIGAUD, J. L. Characterization of a hyperthermophilic P-type ATPase from *Methanococcus jannaschii* expressed in yeast. **J Biol Chem** v. 277, p. 29608–29616, 2002.

MORTH, J. P.; PEDERSEN, B. P.; BUCH-PEDERSEN, M. J.; ANDERSEN, J. P.; VILSEN, B.; PALMGREN, M. G.; NISSEN, P. A structural overview of the plasma membrane Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-ATPase ion pumps. **Nature.** v. 12, 2011.

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

MUNNS, R. Genes and salt-tolerance: bringing them together. **New Phytologist.** v. 3, p. 645-663, 2005.

MUNNS, R. & TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance, **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651–681, 2008.

NEVES, A. L. R. Irrigação do feijão-de-corda com água salina em diferentes estádios de desenvolvimento e seus efeitos na planta e no solo. Fortaleza:, **Dissertação** (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil, 2008).

NÜHSE T. S.; STENSBALLE A.; JENSEN O. N.; PECK S. C. Phosphoproteomics of the Arabidopsis plasma membrane and a new phosphorylation site database, **Plant Cell** v.16, p. 2394–2405, 2004.

NÜHSE, T. S.; STENSBALLE, A.; JENSEN, O. N.; PECK, S. C. Large-scale analysis of in vivo phosphorylated membrane proteins by immobilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry, **Mol. Cell. Proteomics**. v.2, p. 1234–1243, 2003.

OH, D. H.; ZAHIR, A.; YUN, D. J.; BRESSAN, R. A.; BOHNERT, H. J. SOS1 and halophytism. **Plant Signal Behav.** v. 4, n. 11, p. 1081-3, 2009.

OLIVEIRA, L. M. N. Papel da V-ATPase e de enzimas antioxidantes nos mecanismos de ajustamento ao estresse salino em feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L) Walp). **Tese** (Doutorado em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil, 2007).

OLIVEIRA, R. A.; HERCULANO, L.; OLIVEIRA, A. L. B.; WILLADINO, R. L. Estresse salino: avaliação dos níveis de prolina e biomassa em variedades de cana de açúcar. **X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010** – UFRPE: Recife, 18 a 22 de outubro.

OH, D.; LEE, Y. S.; BRESSAN, R. A.; YUN, D.; BOHNERT, H. J. Intracellular consequences of SOS1 deficiency during salt stress. **J. Exp. Bot.** v. 61, n. 4, p. 1205-1213, 2010.

OHTA, M.; HAYASHI, Y.; NAKASHIMA, A.; HAMADA, A.; TANAKA, A.; NAKAMURA, T.; HAYAKAWA, T. Introduction of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. **FEBS Letters**. v. 532, n. 3, p. 279-282, 2002.

OTOCH, M. L. O. As bombas de prótons do tonoplasto de hipocótilos de *Vigna unguiculata*(L.) Walp e sua participação no estresse salino. **Tese** (Doutorado em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil, 1999).

PAIVA, J. B.; TEÓFILO, E. M.; SANTOS, J. H. R. dos; LIMA, J. A. de A.; GONÇALVES, M. de F. B.; SILVEIRAS, L. de F. S. "SETENTÃO" UMA NOVA CULTIVAR DE FEJÃO-DE-CORDA PARA O ESTADO DO CEARÁ. **Acta Botânica Brasilica**. Feira de Santana/BA, v. 4, n. 2, p. 165-169, 1990.

PALMGREN, M. G. & CHRISTENSEN, G. Functional comparisons between plant plasma membrane H<sup>(+)</sup>-ATPase isoforms expressed in yeast, **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 3027–3033, 1994.

PALMGREN, M. G. Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: powerhouses for nutrient uptake, **Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.** v. 52, p. 817–845, 2001.

PALMGREN, M. G. Proton gradients and plant growth, **Adv. Bot. Res.** v. 28, p. 1–70, 1998.

PÁNKE, O.; GUMBIOWSKI, C.; JUNGE, W.; ENGELBRECHT, S. F-ATPase: specific observation of the rotating c subunit oligomer of EF<sub>0</sub>EF<sub>1</sub>. **FEBS letters**, v. 472, p. 34-38, 2000.

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.

PIZARRO, J. C. A. Sistema de absorção de K<sup>+</sup> de alta afinidade em plantas de sorgo forrageiro: papel da H<sup>+</sup>-atpase de membrana plasmática e dos componentes sensível e não-sensível ao íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Ceará: Fortaleza - CE, 2010.

QIU, Q.; GUO, Y.; DIETRICH, M.; SCHUAKER, K. S.; ZHU, J. K. Characterization of the plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in *Arabidopsis thaliana*. **Abstr. Int. Workshop Plant Membr. Biol.**, 12th, Madison, Wis., p. 235, 2001.

QIU, Q. S.; BARKLA, B. J.; VERA-ESTRELLA, R.; ZHU, J. K.; SCHUMAKER, K. S. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity in the plasma membrane of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1041-1052, 2003.

QUEIRÓS, F.; FONTES, N.; SILVA, P.; ALMEIDA, D.; MAESHIMA, M.; GERÓS, H.; FIDALGO, F. Activity of tonoplast proton pumps and Na<sup>+</sup>; H<sup>+</sup> exchange in potato cell cultures is modulated by salt. **Journal of Experimental Botany** v. 60, p. 1363-1374, 2009.

QUÉROA, A.; MOLINIÉA, R.; ELBOUTACHFAITIA, R.; PETIT, E.; PAU-ROBLOTA, C.; GUILLOTB, X.; MESNARD, F.; COURTOISA, J. Osmotic stress alters the balance between organic and inorganic solutes in flax (*Linum usitatissimum*). **Journal of Plant Physiology**. v. 171, p. 55– 64, 2014.

QUINTERAO, F. J.; MARTINEZ-ATIENZA, J.; VILLAALTA, I.; JIANG, X.; KIM, W. Y.; ALI, Z.; FUJI, H.; MENDOZA, I.; YUN, D. J.; ZHU, J. K. PARDO, J. M. Activation of the plasma membrane Na/H antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 8, n. 108, p. 2611-6, 2011.

RATAJCZAK, R. Structure, function and regulation of the plant vacuolar H<sup>+</sup>-translocating ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1465, 17-36, 2000.

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

RENGEL, Z. & DAMON, P.M. Crops and genotypes differ in efficiency of potassium uptake and use. **Physiologia Plantarum**, v. 113, p. 624-636, 2008.

REN, Z. H.; GAO, J. P.; LI, L. G., CAI, X.L., HUANG, W.; CHAO, D. Y.; ZHU, M. Z.; WANG, Z. Y.; LUAN, S. & LIN, H. X. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. **Nature Genetics**. v. 37, p. 1141–1146, 2005.

ROCKEL, B.; BLASIUS, B.; BECK, F.; RATAJCZAC, R.; LÜTTGE, U. **Cell. Mol. Biol. Letters**. v. 2, p. 69-76, 1997.

ROCHA, M. M. O feijão-caupi para consumo na forma de feijão fresco. 2009.

Disponível em: < [www.agrosoft.org.br/agropag/212374.htm](http://www.agrosoft.org.br/agropag/212374.htm)>.

Acesso em: 13/01/2014.

RODRÍGUES-ROSALES, M. P. *et al.* Plant NHX cation/proton antiporters. **Plant Signaling & Behavior**. v. 4, n. 4, 2009.

RUBIO, F.; GASSMANN, W.; SCHROEDER, J. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. **Science**, v. 270, p. 1660-1663, 1995.

SAITOU, N. & NEI, M. The Neighbor-Joining method-a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**; v. 4, p. 406-25, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y., **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p. 1659, 1989.

SÁNCHEZ-BARRENA, M. J.; MARTÍNEZ-RIPOLL, M.; ZHU, J. K.; ALBERT, A. The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response. **J. Mol. Biol.** v. 345, p. 1253-1264, 2005.

SANTI, S.; CESCO, S.; VARANINI, Z.; PINTON, R. Two plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants, **Plant Physiol. Biochem.** v. 43, p. 287-292, 2005.

SANTOS, D.; GUIMARÃES, V. F.; KLEIN, J.; FIOREZE, S. L.; JÚNIOR, E. K. M. Cultivares de trigo submetidas a déficit hídrico no início do florescimento, em casa de vegetação. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.** v. 16, n.8, 2012.

SAKAKIBARA, Y.; KOBAYASHI, H.; KASAMO, K. Isolation and characterization of cDNAs encoding vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphates isoforms from rice (*Oryza sativa* L.) **Plant Mol. Biol.** v. 31, p. 1029-1038, 1996.

SARAFIAN, V.; KIM, Y.; POOLE, R. J.; REA, P. A. Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 89, p. 1775-1779, 1992.

SAZUKA, T.; KETA, S.; SHIRATAKE, K.; YAMAKI, S.; SHIBATA, D. A proteomic approach to identification of transmembrane proteins and membrane-anchored proteins of *Arabidopsis thaliana* by peptide sequencing, **DNA Res.** v.11, p. 101–113, 2004.

SÉRVULO, M. S., SILVA, A. N., ALVES, H. R. GHEYI, NAPOLEÃO E. DE M. BELTRÃO, LIV S. SEVERINO & FREDERICO A. L. SOARES, Desenvolvimento e produção de duas cultivares de mamoneira sob estresse salino **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 4, p. 335–342, 2008.

SILVA, L. D.; ARAÚJO, T. S.; OLIVEIRA, P. S.; GOMES, F. P.; LAVIOLA, B. G.; TOMAZ, M. A. Ajustamento osmótico e acúmulo de solutos orgânicos em folhas de pinhão manso submetido ao déficit hídrico, **64º Congresso Nacional de Botânica**. Belo Horizonte, 10-15 de Novembro de 2013.

SILVA, M.B.R.; FERNANDES, P.D.; NETO, J.D.; NERY, A.R.; RODRIGUES, L.N.; VIÉGAS, R.A. Crescimento e produção do pinhão-manso irrigado com água residuária sob condições de estresse hídrico<sup>1</sup>, **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.15, n.6, p.621–629, 2011 Campina Grande, PB, UAEA/UFCEG

SILVEIRA, J. A. G.; SILVA, S. L. F.; SILVA, E. N.; VIEGAS, R. A. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. 2010, In: SIRINGAM. K.; JUNTAWONG, N.; CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Relationships between sodium ion accumulation and physiological characteristics in rice (*Oryza sativa* L. spp. indica) seedlings grown under iso-osmotic salinity stress. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, p. 1837-1850, 2009.

SI, Y.; ZHANG, C.; MENG, S.; DANE, F. Gene expression changes in response to drought stress in *Citrullus colocynthis*. **Plant Cell Rep.** v. 28, n. 6, p. 997-1009, 2009.

SHABALA, S. & CUIN, T. A. Potassium transport and plant tolerance. **Physiologia Plantarum** v. 133, p. 651-669, 2007.

SHI, H.; QUINTERO, F. J.; PRADO, J. M. & ZHU, J. K. The putative plasma membrane  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  antiporter SOS1 controls long-distance  $\text{Na}^+$  transport in plants. **The Plant Cell** v. 14, p. 465–477, 2002.

SHEN, H.; HE, L. F.; SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; ZHENG, S. J.; LIGABA, A.; YAN, X. L.; AHN, S. J.; YAMAGUCHI, M.; SASAKAWA, H. Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress, **Plant Physiol.** v. 138, p. 287–296, 2005.

SPETH, C.; JASPERT, N.; MARCON, C.; OECKING, C.; Regulation of the plant plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase by its C-terminal domain: what do we know for sure? **European Journal of CellBiology** v.89, p.145–151, 2010.

SPERANDIO, M. V. L.; SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Isoforms of plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase in rice root and shoot are differentially induced by starvation and resupply of  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NH}_4^+$ . **Plant Science**, v. 180, p. 251–258, 2011.

STRANGE, K. Cellular volume homeostasis. **Advances in physiology education**, v. 28, p. 155-159, 2004.

SUNARPI, H. T.; MOTODA, J.; KUBO, M., *et al.* Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced  $\text{Na}^+$  unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. **The Plant Journal** v. 44, p. 928–938, 2005.

SZE, H.; SCHUMACHER, K.; MULLER, M. L.; PADMANABAN, S.; TAIZ, L. A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. **Trends in Plant Science** v. 7, p. 157-161, 2002.

SERRANO, R. Salt tolerance in plants and microorganisms; toxicity targets and defense responses. **International Review of Cytology** v. 165, p. 1-52, 1996.

SHABALA, S. & CUIN, T.A. Potassium transport and plant tolerance. **Physiologia Plantarum** v. 133, p. 651-669, 2007.

SHAHOLLARI, B.; PESKAN-BERGHÖFER, T.; OELMÜLLER, R. Receptor kinases with leucine-rich repeats are enriched in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains from plants, **Physiol. Plant.** v. 122, p. 397–403, 2004.

SHAO, H.; CHU, L.; JALEEL, C. A.; ZHAO, C. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **C. R. Biologies.** v. 331, p. 215-225, 2008.

SHI, H.; ISHITANI, M.; KIM, C.; ZHU, J.K. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 97, p. 896–901, 2000.

SHI, H.; QUINTERO, F. J.; PRADO, J. M.; ZHU, J. K. The putative plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 controls long-distance Na<sup>+</sup> transports in plants. **The Plant Cell**, v. 14, p. 465-477, 2002.

SIBOLE, J. V.; CABOT, C.; MICHALKE, W.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELO, J. Relationship between expression of the PM H<sup>+</sup>-ATPase, growth and ion partitioning in the leaves of salt-treated *Medicago* species. **Planta.**, v. 221, p. 557–566, 2005.

SILVA JÚNIOR, L. G.; GHEYI, R. H.; MEDEIROS, J. F. Composição química das águas do nordeste cristalino brasileiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.** v. 3, p. 11-17, 1999.

SOBREIRA, A. C. M. Atividade e expressão das bombas de prótons de tonoplasto de *Vigna unguiculata* (L.) Walp em condição de estresse salino. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil, 2003).

SOBREIRA, A. C. M. Estudo da expressão dos genes das bombas de prótons (V-ATPase e V-Ppase) e dos contra-transportadores vacuolares (NHX) de *Vigna unguiculata* (L.) Walp submetidos a estresses abióticos. **Tese** (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil, 2009).

SONDERGAARD, T. E.; SCHULZ, A.; PALMGREN, M. G. Energization of transport processes in plants. roles of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, **Plant Physiol.** v. 136, p. 2475–2482, 2004.

SOTTOSANTO, J. B.; SARANGA, Y.; BLUMWALD, E. Impacto f *AtNHX1*, a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, upon gene expression during short- and long-term salt stress in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology.** v. 7, 2007.

TAIZ, L. & ZEIGER, E.; **Plant physiology**, 5 ed. Sinaner associantra inc, 2013.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TANJI, K. K. Agricultural salinity assessment and management. **ASCE**, New York, 1990.

TANG, R. J.; LIU, H.; BAO, Y.; LV, Q. D.; YANG, L.; ZHANG, H. X. The woody plant poplar has a functionally conserved salt overly sensitive pathway in response to salinity stress. **Plant Mol Biol.** v. 74, n. 4-5, p. 367-380, 2010.

TESTER, M.; DAVENPORT, R.; Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. **Annals of Botany**, v. 91, p. 503-527, 2003.

TIMKO, M. P.; RUSHTON, P. J.; LAUDEMANN, T. W.; BOKOWIEC, M. T.; CHIPUMURO, E.; CHEUNG, F.; TOWN, C. D.; CHEN, X. Sequencing and analysis of the gene-rich space of cowpea. **BMC Genomics** v. 9, p. 1-20, 2008.

TORQUATO, J.P.P.; Interação de fósforo e molibdênio nas concentrações de nutrientes e na produção de Feijão Caupí. **Dissertação** (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil, 2009).

TSUGANE, K.; KOBAYASHI, K.; NIWA, Y.; OHBA, K.; KOBAYASHI, H. A. Recessive *Arabidopsis* mutante that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. **The Plant Cell**. v.11, p. 1195-1206, 1999.

VANDESOMPELE, J. ; DE PRETER, K. ; PATTYN, F. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, p. 18, 2002.

VAN, VOLKENBURGH, E. Leaf expansion—an integrating plant behaviour. **Plant Cell Environ**. v. 22, p. 1463–1473, 1999.

VERDCOURT, B. Studies in the Leguminosae - Papilionoideae for the "Flora of Tropical East Africa": IV. **Kew Bulletin** v. 24, 1970.

VIANA, S. B. A.; FERNANDES, P. D.; GHEYI, H. R.; SOARES, F. A. L.; CARNEIRO, P.T. Índices morfofisiológicos e de produção de alface sob estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 8, p. 23-30, 2004.

VITART, V.; BAXTER, I.; DOERNER, P.; HARPER, J. F. Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the root endodermis. **Plant J**. v. 27, p. 191–201, 2001.

VOGELI-LANGE, R. E. & WAGNER, G. J. Subcellular localization of cadmium, sodium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. **Plant Physiol**. v. 92, p. 1086-1093, 1990.

XINGYU, J.; LEIDI, E. O.; PARDO, J. M. How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? **Plant Signaling & Behavior**. v. 5, n. 7, p. 792-795, 2010.

XUE, Z. Y.; ZHI, D. Y.; XUE, G. L.; ZHANG, H.; ZHAO, Y. X.; XIA, G. M. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum sativum L.*) expressing a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na<sup>+</sup>. **Plant Sci.** v. 167, p. 848-889, 2004.

XU, T. & FORGAC, M. Subunit D (Vma8p) of the yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase plays a role in coupling of proton transport and ATP hydrolysis. **J. Biol. Chem** v. 275, p. 22075-22081, 2000.

WANG, D.; AMORNSIRIPANITCH, N.; DONG, X. A. genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. **PLoS Pathog**: v. 2, p. 1042–1050, 2006.

YANG, Y.; QIN, Y.; XIE, C.; ZHAO, F.; ZHAO, J.; LIU, D.; CHEN, S.; FUGLSANG, A. T.; PALMGREN, M. G.; SCHUMAKER, K. S.; DENG, X. W.; GUO, Y. The *Arabidopsis* Chaperone J3 Regulates the Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase through Interaction with the PKS5 Kinase. **The Plant Cell**, v. 22, p. 1313 - 1332, 2010.

YANG, Y.; ZHANG, F.; ZHAO, M.; AN, L.; ZHANG, L.; CHEN, N. Properties of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in salt-treated *Populus euphratica* callus. **Plant Cell Rep.**, v. 26, p. 229–235, 2007.

YE, C.; ZHANG, H.; CHEN, J.; XIA, X.; YIN, W. Molecular characterization of putative vacuolar NHX-type Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger genes from the salt-resistant tree *Populus euphratica*. **Physiologia Plantarum** 2009.

YOKOI, S.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Salt stress tolerance of plants, **JIRCAS Working Report**. p. 25-33, 2002.

YU, J. N.; HUANG, J.; WANG, Z. N.; ZHANG, J. S.; CHEN, S. Y. An Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport gene from wheat plays an important role in stress tolerance. **J. Biosci** v. 32, p. 1153-1161, 2007.

YU, J.; CHEN, S.; ZHAO, Q.; WANG, T.; YANG, C.; DIAZ, C.; SUN, G.; DAI, S. Physiological and Proteomic Analysis of Salinity Tolerance in *Puccinellia tenuiflora*. **J. Proteome Res.** v. 2, n. 10(9), p. 3852-70, 2011.

ZAHRAN, M. H.; MARIN-MANZANO, M. C.; SÁNCHEZ-RAYA, A. J.; BEDMAR, E. J.; VENEMA, K.; RODRÍGUEZ-ROSALES, M. Effect of salt stress on the expression of *NHX*-type ion transporters in *Medicago intertexta* and *Melilotus indicus* plants. **Physiologia Plantarum** v. 131, p. 122-130, 2007.

ZHANG, H. X. & BLUMWALD, E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. **Nat Biotechnol.** v. 19, n. 8, p. 765-768, 2001.

ZHANG, L. *et al.*, Morphological and Physiological Responses of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Plants to Salinity **PLoS One.** v. 9, n. 1, 2014.

ZHAO, R.; DIELEN, V.; KINET, J. M.; BOUTRY, M. Cosuppression of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth, and male fertility. **Plant Cell.** v. 12, p. 535–546, 2000.

ZHAO, Q.; ZHAO, Y.; ZHAO, B.; GE, R.; LI, M.; SHEN, Y.; HUANG, Z. Cloning and functional analysis of wheat V-H<sup>+</sup>-ATPase subunit gene. **Plant Mol Biol** v. 69, p. 33-46, 2009.

ZHU, J. K. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.** v. 124, p. 941–948, 2000.

ZHU, J. K.; LIU, J.; XIONG, L. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*: evidence of a critical role for potassium nutrition. **Plant Cell** v. 10, p. 1181–92, 1998.

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

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

ZHU, J. K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Curr Opin Plant Biol**. v. 6, p. 441–5, 2003.