



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

**GEORGIA MESQUITA DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO FOLIAR COM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> SOBRE O PROTEOMA E  
ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PLANTAS DE FEIJÃO-DE-CORDA  
SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO**

**FORTALEZA**

**2016**

**GEORGIA MESQUITA DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO FOLIAR COM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> SOBRE O PROTEOMA E  
ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PLANTAS DE FEIJÃO-DE-CORDA  
SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO**

Tese apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. José Hélio da Costa  
Coorientador: Dr. Elton Camelo Marques

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2016**

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)

---

- O47e Oliveira, Georgia Mesquita de.  
Efeito do pré-tratamento foliar com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre o proteoma e enzimas antioxidantes em plantas de feijão-de-corda submetidas ao estresse salino / Georgia Mesquita de Oliveira. – 2016.  
126 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. José Hélio Costa.  
Coorientação: Prof. Dr. Elton Camelo Marques.
1. Salinidade. 2. Peróxido de hidrogênio. 3. Proteômica. 4. Aclimação. I. Título.

CDD 572

---

**GEORGIA MESQUITA DE OLIVEIRA**

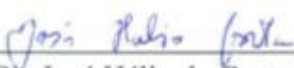
**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO FOLIAR COM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> SOBRE O PROTEOMA E  
ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PLANTAS DE FEIJÃO-DE-CORDA  
SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO**


Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

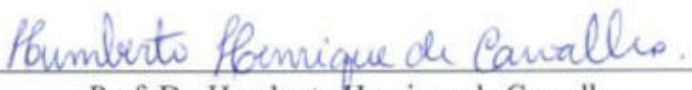
Área de concentração: Bioquímica Vegetal


Aprovado em: 25/07/2016

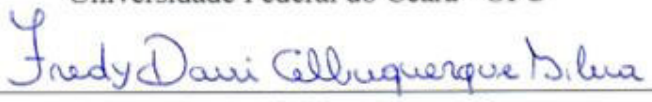
**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Hélio da Costa (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Eneás Gomes Filho  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho  
Universidade Estadual do Ceará - UFC

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Bruno Lopes de Sousa  
Universidade Federal do Ceará - UFC

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Fredy Davi Albuquerque Silva.  
Universidade Federal do Ceará - UFC

Especialmente aos meus pais, Maria Irlanda e Francisco Alísio (*in memoriam*), e ao meu esposo, Simão por todo amor incondicional que me alicerçaram nesta jornada.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu amado Deus, pelo dom da vida e saúde concedida por todos esses anos. Minha maior fonte de energia para realização das batalhas diárias, sem ti nada sou.

Ao Prof. José Hélio Costa agradeço pelo acolhimento em seu laboratório, pelo apoio e a orientação durante esses anos.

À Profa. Dirce Fernandes de Melo pelo exemplo de mulher, pela formação humana diária, por todos os conselhos, carinho e apoio.

Ao Dr. Elton Camelo Marques pela coorientação da parte fisiológica e bioquímica, por todas as ideias, paciência e apoio durante o trabalho.

À Profa. Dra. Rosilene Oliveira Mesquita pelos esclarecimentos e pelas contribuições valiosas nas análises dos mapas bidimensionais.

Ao Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano por aceitar realizar as análises de espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Franklin Aragão Gondim pela ajuda concedida ao início do projeto.

Ao Prof. Enéas Gomes Filho pela disponibilidade em participar da banca examinadora, pelas sugestões realizadas ao trabalho, e por permitir utilizar seu laboratório durante os experimentos.

Ao Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho, Dr. Bruno Lopes de Sousa e Dr. Fredy Davi Albuquerque Silva por aceitarem participar prontamente, pela compreensão, e todas as sugestões realizadas ao trabalho.

Aos meus pais, Maria Irlanda Mesquita de Oliveira e Francisco Alísio de Oliveira (em memória) que me propiciaram à vida e a minha formação. A minha mãe por me propiciar à continuidade nos estudos, por todo esforço, pela compreensão, incentivo e amor incondicional, em todos os momentos da minha vida.

A meu irmão Ciro Mesquita pelo carinho e força nas mais diversas horas.

Ao meu esposo Simão Melo Gurgel por todo amor, paciência, estímulo e dedicação na minha vida durante todos esses anos, especialmente no momento final da realização desse trabalho.

Aos demais familiares, especialmente Yolanda Mesquita e Benjamim Alvino que sempre estiveram na torcida para a realização dos meus objetivos.

A todos os bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Bioenergética, especialmente Janaína, Thaís, Tainá e Karol, assim como as técnicas Joana e Michele pela colaboração aos experimentos realizados.

Aos colegas do Laboratório de Bioenergética Vegetal agradeço pela ajuda partilhada.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica que direta ou indiretamente contribuíram com seus ensinamentos para a minha formação, bem como aos demais funcionários, especialmente Maria Gildemar, Pedro e Daniel.

A todos os colegas do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Fruto e de Fisiologia Vegetal, especialmente Mônica, Marcela, Dalton, Rafael, Lineker e Lucas por toda ajuda prestada durante a realização dos experimentos.

A todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de pós-graduação concedida a autora deste trabalho, através de convênio com o Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do projeto, através do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTSal).

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, cujos laboratórios esta pesquisa foi realizada.



“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

## RESUMO

O feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. ] tem grande importância nutricional e socioeconômica no Brasil. Entretanto, no Nordeste há um declínio da sua produção agrícola, que pode estar associado com o aumento da salinidade do solo. É conhecido que a salinidade causa mudanças metabólicas, acelerando a produção das espécies reativas de oxigênio (EROS). Elas levam a diversos danos na célula, mas também desempenham um papel crucial como moléculas sinalizadoras na aclimação a vários estresses abióticos. Por essa razão, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do pré-tratamento foliar com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em plantas de feijão-de-corda sobre a aclimação ao estresse salino, estudando os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares. Para tanto, dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sob condições hidropônicas, utilizando a cultivar TVu 2331. No primeiro experimento foram avaliadas as mudanças fisiológicas, induzidas pelo pré-tratamento foliar de  $H_2O_2$  em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100 mM), em plantas submetidas ao tratamento salino (NaCl 80 mM). Os resultados demonstraram que a pulverização da solução de  $H_2O_2$  na concentração de 25 mM foi capaz de amenizar os efeitos deletérios da salinidade sobre o crescimento. A partir disso, em um segundo experimento foram avaliados os efeitos dessa concentração de  $H_2O_2$  no pré-tratamento foliar sobre as mudanças bioquímicas e proteômicas em plantas sob tratamento salino. Constatou-se o envolvimento das enzimas SOD e CAT nos tempos iniciais após a aplicação de  $H_2O_2$ , indicando uma resposta antioxidante. Entretanto, na presença de NaCl, a peroxidação lipídica não foi reduzida devido a pulverização foliar com  $H_2O_2$ . No estudo proteômico verificou-se que o pré-tratamento com água e tratamento salino foi capaz de modificar a expressão de 38 proteínas, o pré-tratamento com  $H_2O_2$  e tratamento salino alterou a expressão de 28 proteínas e o pré-tratamento com  $H_2O_2$  modificou a expressão de 11 proteínas. Entre essas proteínas, 44 tiveram suas identidades determinadas por espectrometria de massa (ESI-Q-TOF). A maioria das proteínas identificadas nos tratamentos realizados estavam relacionadas com o processo de fotossíntese, proteção/defesa e ao metabolismo dos carboidratos. Enquanto que o tratamento salino revelou uma diminuição da expressão das proteínas fotossintéticas, o pré-tratamento com  $H_2O_2$  possibilitou primordialmente o seu aumento, como observado para a Rubisco e da proteína relacionada a evolução do oxigênio (OEE2). Esse tratamento foi também capaz de ativar proteínas envolvidas na proteção/defesa como: redutase da glutatona, chaperonina cloroplástica, APX citosólica e POB1 BTB/POZ. Os dados obtidos revelam respostas bioquímicas e moleculares da cultivar TVu envolvidas na aclimação ao estresse salino,

previamente tratados com  $H_2O_2$ . O conhecimento adquirido gera perspectivas para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas a fim de se obter cultivares mais tolerantes à salinidade.

**Palavras chave:** Salinidade. Peróxido de hidrogênio. Proteômica. Aclimação.

## ABSTRACT

The cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] has a great nutritional and socioeconomic importance in Brazil. However, in the Northeastern there is a decline in its agricultural production, which might be associated with an increased salinity in the soil. It is known that salinity causes metabolic changes, accelerating the production of reactive oxygen species (ROS). They lead to several damage in cells, but also play a crucial role as signaling molecules for acclimation to various abiotic stresses. For this reason, the aim of this work was to evaluate the effects of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) leaf pretreatment in cowpea plants on acclimation to salt stress, studying the physiological, biochemical and molecular mechanisms. Therefore, two experiments were conducted in a greenhouse under hydroponic conditions, using the cowpea, cultivar TVu 2331. In the first experiment, were evaluated physiological change induced by  $H_2O_2$  leaf spraying pretreatment in different concentrations (1, 5, 10, 25, 50 e 100 mM), in cowpea plants subjected to salt treatment (NaCl 80 mM). The results showed that the spraying with 25 mM  $H_2O_2$  solution was able to alleviate the deleterious effects of salinity on growth. From this point, in the second experiment, were evaluated the effects of this concentration of  $H_2O_2$  leaf pretreatment on the biochemical and proteomic changes in plants during saline treatment. It was found the involvement of enzymes SOD and CAT in the initial times after spraying of  $H_2O_2$ , indicating an antioxidant response. However, in the presence of NaCl, the lipid peroxidation was not reduced by  $H_2O_2$  spraying. In the proteomic study it was verified that pretreated with water and salt treatment altered the expression of 38 proteins, as  $H_2O_2$  pretreatment and saline treatment were able to alter expression of 28 proteins and pretreatment with  $H_2O_2$  was only able to change expression 11 proteins. Among these proteins, 44 of them had their identity determined by mass spectrometry (ESI-Q-TOF). Most of the identified proteins in the treatments performed were related to the photosynthetic process, to protection / defense and to carbohydrate metabolism. However, in the saline treatment revealed a decrease in the expression the proteins related to photosynthesis, it was observed that the pretreatment with  $H_2O_2$  was able to enhance the expressed proteins, such as Rubisco and protein related to oxygen evolution (OEE2). In addition, that treatment displayed the largest number of proteins associated with protection/defense, such as glutathione reductase, chloroplast chaperonin, cytosolic APX and POB1 BTB/POZ. These data should contribute to a better understanding of the biochemical and molecular mechanisms of cowpea, TVu cultivar, involved in acclimation to salt stress previously treated with  $H_2O_2$ . The acquired knowledge generates perspectives for

the development of biotechnological strategies in order to obtain cultivars that are more tolerant to salinity.

**Keywords:** Salinity. Hydrogen peroxide. Proteomics. Acclimation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Formação das espécies reativas de oxigênio (A), e atuação do complexo enzimático antioxidante (B) Fonte: (APPEL; HIRT, 2004). ..... 37
- Figura 2 - (A) Pré-tratamento utilizando um agente químico resultando no aumento da tolerância. (B) Agente químico aplicado em um órgão que leva a ativação de vias de sinalização e acumulação de sinais de tolerância dormentes (Fonte: SAVVIDES *et al.*, 2016). ..... 41
- Figura 3 - Área foliar (AF) de plantas de feijão-de-corda sob condições controle ou salina (NaCl 80 mM), pulverizadas com água destilada ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100 mM). Os dados referem-se a coleta realizada após 240 h do início da pulverização com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Valores com letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes entre si de acordo com o teste de Tukey (P <0,05). .... 57
- Figura 4 - Matéria seca da parte aérea (MSPA) de plantas de feijão-de-corda sob condições controle ou salina (NaCl 80 mM), pulverizadas com água destilada ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100 mM). Os dados referem-se a coleta realizada após 240 h do início da pulverização com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Valores com letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes entre si de acordo com o teste de Tukey (P<0,05). ..... 58
- Figura 5 - Matéria seca das raízes (MSR) de plantas de feijão-de-corda sob condições controle ou salina (NaCl 80 mM), pulverizadas com água destilada ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100 mM). Os dados referem-se a coleta realizada após 240 h do início da pulverização com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Valores com letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes entre si de acordo com o teste de Tukey (P<0,05). ..... 58
- Figura 6 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em folhas de feijão-de-corda, cultivar TVu, sob os seguintes tratamentos: água/controle, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle, água/salino e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino. Os dados referem-se às coletas realizadas nos tempos: 0, 48, 96 e 240 h após a pulverização das folhas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 25 mM. .... 61
- Figura 7 - Atividade da enzima catalase (CAT) de plantas de feijão, cultivar TVu, sob os seguintes tratamentos: água/controle, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle, água/salino e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino. Os

dados referem-se as coletas realizadas nos tempos: 0, 48, 96 e 240 h após a pulverização das folhas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 25 mM..... 62

Figura 8 - Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) de plantas de feijão, cultivar TVu, sob os seguintes tratamentos: água/controle, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle, água/ salino e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino. Os dados referem-se as coletas realizadas nos tempos: 0, 48, 96 e 240 h após a pulverização das folhas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 25 mM. .... 63

Figura 9 - Conteúdo de MDA de plantas de feijão-de-corda, cultivar TVu, sob os seguintes tratamentos: água/controle, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle, água/ salino e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino. Os dados referem-se as coletas realizadas nos tempos: 0, 48, 96 e 240 h após a pulverização das folhas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 25 mM. .... 65

Figura 10 – Géis do tratamento água/controle (A) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle (B) mostrando os *spots* proteicos reguladas diferencialmente em folhas de feijão-de-corda, cultivar TVu, sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25mM), em 240 h. Nos géis, as setas em vermelho indicam menor abundância dos spots proteicos e as setas em azul maior. Os mapas foram obtidos usando tiras de gel de 13 cm com gradiente de pH 4-7 na focalização isoeletrica e géis de poliacrilamida a 12,5% na SDS-PAGE. Cada gel foi carregado com 400 µg de proteínas. Os *spots* proteicos foram visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250. .... 68

Figura 11 - Diagrama de Venn representando diferentes subconjuntos de proteínas em folhas de feijão-de-corda, cultivar TVu, mostrando mudanças em sua abundância, sob o tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle, água/salino e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino em relação ao tratamento controle. .... 69

Figura 12 – Géis do tratamento água/salino (C) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino (D) mostrando os *spots* proteicos reguladas diferencialmente em folhas de feijão-de-corda, cultivar TVu, sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25mM), em 240 h. Nos géis, as setas em vermelho indicam menor abundância dos spots proteicos e as setas em azul maior. Os mapas foram obtidos usando tiras de gel de 13 cm com gradiente de pH 4-7 na focalização isoeletrica e géis de poliacrilamida a 12,5% na SDS-PAGE. Cada gel foi carregado com 400 µg de proteínas. Os *spots* proteicos foram visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250. .... 70

Figura 13 - Detalhes dos <i>spots</i> proteicos que foram diferencialmente expressos e identificados no cultivar TVu, sob os tratamentos água/controle e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /controle.....	75
Figura 14 - Detalhes dos <i>spots</i> proteicos que foram diferencialmente expressos e identificados no cultivar TVu, sob os tratamentos água/controle e água/salino.....	84
Figura 15 - Detalhes dos <i>spots</i> proteicos que foram diferencialmente expressos no cultivar TVu, sob os tratamentos água/controle e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /salino. ....	95



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Pré-tratamento realizado sobre as folhas de feijão-de-corda com água destilada ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100 mM) e tratamento adicionado à solução nutritiva (NaCl 80 mM) ou nenhum. .... 47
- Tabela 2 - Pré-tratamento realizado sobre as folhas de feijão-de-corda com água destilada ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 mM) e tratamento adicionado à solução nutritiva, (NaCl 80 mM) ou nenhum..... 48
- Tabela 3 - Comparações entre os valores médios de atividade da superóxido dismutase (SOD) em folhas de plantas de feijão-de-corda, após 48, 96 e 240 h do início da pulverização com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de pré-tratamento, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). ..... 61
- Tabela 4 - Comparações entre os valores médios de atividade da catalase (CAT) em folhas de plantas de feijão-de-corda, após 48, 96 e 240 h do início da pulverização com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de pré-tratamento, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). ..... 62
- Tabela 5 - Comparações entre os valores médios de atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em folhas de plantas de feijão-de-corda, após 48, 96 e 240 h do início da pulverização com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de pré-tratamento, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). ..... 63
- Tabela 6 - Comparações entre os valores médios do conteúdo de malondialdeído (MDA) em folhas de plantas de feijão-de-corda, após 48, 96 e 240 h do início da pulverização com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de pré-tratamento, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ). ..... 66
- Tabela 7 - Proteínas identificadas a partir das plantas de feijão-de-corda, cultivar TVu, que foram pulverizadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 mM) e permaneceram sob condições controle, em 240 horas. .... 72

Tabela 8 - Proteínas identificadas de folhas de plantas de feijão-de-corda, cultivar TVu, que foram pulverizadas com água e permaneceram sob condições salinas (NaCl 80 mM), em 240 horas. ....	78
Tabela 9 - Proteínas identificadas de folhas de plantas de feijão-de-corda, cultivar TVu, que foram pulverizadas com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (25 mM) e permaneceram sob condições salinas (NaCl 80 mM), em 240 horas. ....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>APX</b>	Ascorbato peroxidase
<b>AsA</b>	Ascorbato reduzido
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CEes</b>	Condutividade elétrica do extrato de saturação
<b>ESI</b>	Ionização por eletrospray
<b>EST</b>	<i>Expressed sequence tags</i>
<b>GR</b>	Glutathiona redutase
<b>GSH</b>	Glutathiona reduzida
<b>GSSG</b>	Glutathiona oxidada
<b>HSP</b>	Proteínas de choque térmico
<b>IEF</b>	Focalização isoeletrica
<b>IPG</b>	Gradientes de pH imobilizado
<b>JA</b>	Ácido jasmônico
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>MS</b>	Espectrometria de Massas
<b>MSPA</b>	Matéria seca da parte aérea
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
<b>EROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SA</b>	Ácido salicílico
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	22
2	HIPÓTESE .....	24
3	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL .....	24
4	REVISÃO DE LITERATURA .....	25
4.1	O feijão-de-corda .....	25
4.2	Solos salinos.....	26
4.3	As plantas e a salinidade.....	28
4.4	As principais espécies reativas de oxigênio.....	30
4.5	Sistema antioxidante enzimático.....	32
4.6	O peróxido de hidrogênio como molécula sinalizadora .....	37
4.7	O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio .....	40
4.8	Proteômica vegetal.....	42
5	OBJETIVOS.....	45
5.1	Objetivo Geral.....	45
5.2	Objetivos Específicos.....	45
6	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
6.1	Experimento I – Escolha da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> adequada para o pré-tratamento das plantas de feijão.....	46
6.2	Material vegetal.....	46
6.2.1	<i>Semeadura, condições de cultivo e tratamentos.....</i>	46
6.2.2	<i>Coleta de material vegetal para as análises fisiológicas.....</i>	47
6.2.3	<i>Análise estatística.....</i>	47
6.3	Experimento II – Aclimação a salinidade mediada pelo pré-tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a 25 Mm.....	48
6.3.1	<i>Semeadura, condições de cultivo e tratamentos.....</i>	48
6.3.2	<i>Coleta de material vegetal para as análises fisiológicas, bioquímicas e moleculares.....</i>	48
6.3.3	<i>Preparação dos extratos para os ensaios enzimáticos e peroxidação lipídica..</i>	48
6.3.4	<i>Atividade da superóxido dismutase.....</i>	49
6.3.5	<i>Atividade da catalase.....</i>	49
6.3.6	<i>Atividade do ascorbato peroxidase.....</i>	50
6.3.7	<i>Peroxidação lipídica.....</i>	50
6.3.8	<i>Análise estatística.....</i>	51

<b>6.3.9</b>	<b><i>Padrões eletroforéticos bidimensionais</i></b> .....	51
6.3.9.1	<i>Enzimas e outros reagentes</i> .....	51
6.3.9.2	<i>Extração das proteínas totais</i> .....	51
6.3.9.3	<i>Determinação de proteínas totais</i> .....	52
6.3.9.4	<i>Eletroforese unidimensional</i> .....	52
6.3.9.5	<i>Eletroforese Bidimensional</i> .....	52
6.3.9.6	<i>Análise das imagens</i> .....	54
6.3.9.7	<i>Digestão triptica</i> .....	54
6.3.9.8	<i>Espectrometria de massas por ESI-Q-TOF e identificação das proteínas</i> .....	55
<b>7</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>7.1</b>	<b>Experimento I – Avaliação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que minimizasse os efeitos da salinidade em plantas de feijão-de-corda (cultivar TVu) .....</b>	57
7.1.1	<i>Crescimento</i> .....	57
<b>7.2</b>	<b>Experimento II - Avaliação do envolvimento do sistema antioxidante enzimático e mudanças no proteoma na aclimação à salinidade mediada pelo pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 25 mM.....</b>	60
7.2.1	<i>Dismutase do Superóxido (SOD) .....</i>	60
7.2.2	<i>Catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) .....</i>	61
7.2.3	<i>Danos de membrana (formação de MDA) .....</i>	65
7.2.4	<i>Análise proteômica</i> .....	67
7.2.4.1	<i>Padrões proteicos bidimensionais .....</i>	67
7.2.5	<i>Proteínas identificadas .....</i>	71
7.2.6	<i>Proteínas responsivas ao tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle .....</i>	71
7.2.7	<i>Proteínas responsivas ao tratamento água/salino .....</i>	77
7.2.8	<i>Proteínas responsivas ao tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino .....</i>	90
7.2.9	<i>Visão geral da resposta do feijão-de-corda, cultivar TVu, ao pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> buscando minimizar os efeitos da salinidade .....</i>	98
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	100
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	101

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão é uma espécie cultivada em vários países, possuindo características que tornam o seu consumo benéfico, do ponto de vista nutricional. No Brasil, ele ocupa uma área de cultivo de aproximadamente 3 milhões de hectares, chegando a uma produção de 2,93 milhões de toneladas (FAO, 2013). Entretanto, na região Nordeste, o produtor enfrenta muitos fatores limitantes para o seu cultivo, entre eles, o aumento da salinidade do solo. Nesta região, muitas culturas são fomentadas através da utilização de sistema de irrigação, entretanto, a utilização de água de baixa qualidade acaba agravando o acúmulo de sais no solo. Essa situação é particularmente piorada pela ausência de um manejo adequado da água e do solo pelos produtores (DANTAS *et al.*, 2002).

Desta maneira, a salinidade se destaca como um dos principais desafios ambientais enfrentados pela agricultura mundial, visto que ela é um dos estresses abióticos que mais afeta o crescimento e a produtividade das plantas (VAIDYANATHAN *et al.*, 2003; VEERANAGAMALLAIAH *et al.*, 2007). O estresse salino altera o equilíbrio redox celular, pois acelera a produção das espécies reativas de oxigênio (EROS), causando danos através da oxidação de moléculas biológicas. Para evitar efeitos mais nocivos às biomoléculas, a célula mobiliza os seus mecanismos de defesa, como os sistemas antioxidantes (PANG; WANG, 2008), para tentar enfrentar o estresse provocado.

As práticas convencionais destinadas à solução do problema da salinização dos solos são onerosas e, na maioria das vezes, inviáveis do ponto de vista econômico. Assim, é necessário a busca por alternativas para esse problema, inclusive visando a reincorporação dos solos salinos ao processo de produção agrícola, haja vista que a agricultura mundial tem perdido terras agricultáveis devido à urbanização (MITTLER; BLUMWALD, 2010). Além disso, o aumento da produção, assim como a estabilidade das culturas em áreas sujeitas à salinidade mostra-se importante, para atender ao aumento da população mundial (PELEG *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, a utilização do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) vem se mostrando uma estratégia promissora para mitigar os efeitos do estresse salino, conforme observado em estudos conduzidos nas espécies de arroz (UCHIDA *et al.*, 2002), milho (AZEVEDO NETO *et al.*, 2005), laranja (TANOUE *et al.*, 2009), e feijão-de-corda (HASAN *et al.*, 2016). O peróxido de hidrogênio é uma molécula sinalizadora (PANG; WANG, 2008), que pode ajudar as espécies a se aclimatarem a um estresse ambiental. A aclimação consiste de um processo no qual a exposição prévia de um indivíduo a um determinado tipo de estresse, provoca mudanças

metabólicas que são responsáveis pelo aumento de sua tolerância a uma nova exposição ao estresse. Quando essa exposição prévia é feita com um estresse diferente do segundo, diz que essa aclimatação induziu uma tolerância cruzada (NEILL *et al.*, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Em leguminosa há pouco conhecimento acerca do efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com a tolerância ao estresse salino. Nesse estudo foram investigadas as respostas fisiológicas, bioquímicas e proteômicas a partir da aplicação prévia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e posterior submissão de feijão-de-corda (cultivar TVu) ao estresse salino. O conhecimento gerado poderá validar essa estratégia como promissora para aclimatação do feijão-de-corda à salinidade, bem como revelar mecanismos bioquímicos e moleculares que poderão servir como subsídios para aplicação biotecnológica, objetivando a produção de plantas tolerantes à salinidade.

## **2 HIPÓTESE**

Esse estudo foi realizado a partir de duas questões, a saber: 1) a aplicação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), seria capaz de sinalizar e influenciar na tolerância ao estresse salino? 2) uma vez que a resposta seja positiva, quais mecanismos seriam responsáveis pela aclimação ao estresse salino? A partir dessas indagações, propôs-se a hipótese que a pulverização foliar do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) nas folhas de feijão-de-corda, desempenha um papel importante na aclimação contra os efeitos nocivos da salinidade, por ativação de mecanismos de defesa redox.

## **3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL**

Para testar a hipótese proposta, dois experimentos foram realizados neste estudo com o intuito de analisar as respostas fisiológicas, bioquímicas e proteômicas. O primeiro experimento foi realizado com a finalidade de encontrar a concentração de peróxido de hidrogênio, que pudesse aliviar os efeitos nocivos do estresse salino (NaCl a 80 mM), sobre parâmetros fisiológicos de crescimento. Seis concentrações de peróxido de hidrogênio (1, 5, 10, 25, 50 a 100 mM) foram testadas e ao final a concentração de 25 mM foi a escolhida.

O segundo experimento foi realizado com o intuito de investigar se a aplicação foliar do peróxido de hidrogênio e/ou submissão das plantas ao estresse salino produziam respostas relacionadas a aclimação. Para tanto foram utilizadas as abordagens bioquímicas (enzimas antioxidantes e conteúdo de malondialdeído) e proteômicas (ESI-Q-TOF).



## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 O feijão-de-corda

O feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma espécie anual, herbácea, com metabolismo fotossintético do tipo C3, sendo umas das culturas mais antigas e relevantes no mundo. Ele é uma dicotiledônea, que pertence à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolina, gênero *Vigna*, espécie *V. unguiculata* (FREIRE FILHO *et al.*, 2005). A cultura destaca-se, pois apresenta ampla distribuição mundial, em especial nas regiões tropicais devido às características edafoclimáticas, semelhantes ao seu local de origem (BRITO *et al.*, 2009).

A espécie é nativa do continente africano, no entanto, não há uma concordância quanto ao seu centro de origem. Para Steele e Mehra (1980) e Ng e Marechal (1985), o centro primário da origem e diversidade da espécie seria o oeste da África, mais precisamente na Nigéria. Entretanto, para Padulosi *et al.* (1997) a região da especiação seria a o Transvaal, na República da África do Sul. Independente do centro de origem, o feijão foi dispersado para outras regiões do mundo, principalmente através de migrações e de rotas comerciais. Como relata Freire Filho (1988), a entrada do feijão na América Latina se deu no século XVI, pelos colonizadores espanhóis e portugueses. A entrada ocorreu primeiramente nas colônias espanholas e depois no Brasil, no estado da Bahia. No Brasil, o feijão também foi dispersado pelos colonizadores para outras regiões do Nordeste e do país. A partir disso, outras denominações foram dadas para o feijão, como: feijão caupi, feijão-de-corda, feijão macassar, feijão pardo, feijão de vara, feijão de vaca, feijão baiano e feijão-fradinho (SILVA *et al.*, 2008).

A cultura do feijão-de-corda foi bastante difundida no Nordeste, se tornando umas das principais leguminosas cultivada, comercializada e consumida no semiárido brasileiro. Ela apresenta muitas vantagens, e por isso foi escolhida por muitos produtores que utilizam a agricultura de sequeiro. O feijão tem boa capacidade de fixar nitrogênio em simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* (GUAZELLI, 1988) e grande adaptabilidade (CAMPOS *et al.* 2014), o que permite seu cultivo durante todo o ano. No Brasil tem importância socioeconômica, pois consegue fixar mão-de-obra no campo e gerar renda, além disso seus grãos apresentam alto valor nutritivo, como o elevado teor de proteínas (23 a 25%), carboidratos (62%), fibras, minerais e reduzido conteúdo lipídico (FROTA *et al.*, 2008; BASTOS *et al.*, 2012). Ele pode ser consumido na forma de pasta, farinha e principalmente através dos grãos secos e verdes (FROTA *et al.*, 2009; XU; CHANG, 2012; XIONG; YAO; LI, 2013;

KAPRAVELOU *et al*, 2015). Ele também é útil na alimentação animal, na rotação de culturas e adubação verde para a recuperação da fertilidade dos solos (ARAUJO *et al.*, 1984).

Além da região Nordeste, o cultivo do feijão foi para grandes áreas das regiões Centro-Oeste e Norte, tornando-se a cultura principal ou de safrinha (BEZERRA *et al.*, 2012). Nessas regiões houve uma expansão para exploração comercial em diversas áreas sob condições de irrigação. Mas é ainda na região Nordeste e Norte que se observa o maior consumo de feijão-de-corda, onde dependendo do estado o consumo pode alcançar de 9,2 a 21,8 kg/pessoa/ano. A média regional fica em torno de 15 kg/pessoa/ano (ROCHA; FREIRE FILHO, 2012). Na região Nordeste, observou-se uma maior produção do que na região Centro-Sul, para a 1ª safra de feijão-de-corda 2015-2016. Na 2ª safra, para este mesmo período e região, o estado do Ceará aparece como um dos principais produtores, com 109.900 toneladas, produtividade de 279 kg/ha e um dos maiores em área plantada (CONAB, 2016). Apesar de ter uma grande área destinada à cultura, o rendimento ainda é baixo. Quando comparamos a safra atual com a anterior de 2014-2015, a produtividade média foi de 309 kg/ha havendo um decréscimo em 9,7% (CONAB, 2016).

A cultura do feijão-de-corda permanece abaixo do seu potencial produtivo, pois há muitos fatores que interferem para alavancar esse potencial. Entre os fatores que limitam o desenvolvimento do feijão-de-corda, estão os de origem biótica e abiótica. Na região Nordeste destaca-se os fatores de origem abiótica, como baixa fertilidade, seca e salinidade. Essa região ao enfrentar longos períodos de adversidade ambiental, acaba sofrendo com o desabastecimento de produtos agrícolas, como o feijão, e para manter a circulação desses produtos, é necessário haver importação de outros estados (MAPA, 2015), levando ao aumento nos preços deles. Para tentar compreender como esses fatores abióticos, particularmente a salinidade, interferem no desenvolvimento das plantas de feijão alguns trabalhos têm sido realizados (GOGILE *et al.*, 2013; ABREU *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

## **4.2 Solos salinos**

O início do século XXI é marcado globalmente pelas grandes degradações ambientais, como o aumento da salinização no solo. A salinidade é um dos estresses ambientais que mais provocam reduções na qualidade e produtividade das culturas, assim como na área cultivada (YAMAGUCHI; BLUMWALD, 2005; SHAHBAZ; ASHRAF; HARRIS, 2013). O solo é considerado salino, quando a condutividade eléctrica (CE) do extrato de saturação (ECe),

na zona de raiz é superior a 4 dS m<sup>-1</sup> (USDA-ARS, 2008), isso equivale a uma solução de NaCl 40 mM

A salinização pode originar-se através de dois processos: os que são causados naturalmente e aqueles que ocorrem pela atividade humana. O primeiro é resultado da acumulação de sais no solo ou lençol freático por longo período de tempo. No solo, esses sais solúveis são acumulados quando rochas sofrem intenso desgaste através do intemperismo físico, químico e biológico. Isso leva a liberação do cloreto de sódio, cloreto de cálcio e cloreto de magnésio e em menor extensão dos sulfatos e dos carbonatos. Além disso, a deposição dos sais oceânicos no solo pode ocorrer pelo vento e pela chuva, especialmente nas regiões costeiras. A atividade humana também é responsável pelo acúmulo de sais, que por sua vez, acaba levando a alteração do equilíbrio hidrológico, entre o solo e a água aplicada às culturas (GARG; MANCHANDA, 2008). Entre os fatores que aumentam o acúmulo de sais no solo estão o desmatamento, a substituição da vegetação perene por culturas anuais, e a utilização do sistema de irrigação. Esse último, é bastante utilizado entre os agricultores, para impulsionar a produtividade, mas por vezes, a água usada é rica em sais ou o sistema de irrigação apresenta drenagem insuficiente. Considerando que a água de irrigação classificada de boa qualidade contém até 500 mg de sal solúvel, a perspectiva é de que nos próximos anos haverá um grande incremento de sais no solo. Dessa forma, os sais poderão entrar em contato com o lençol freático e atingir regiões próximas a zona da raiz prejudicando, possivelmente, a absorção de água pela planta. Além disso, quando o solo não possui uma drenagem adequada, o sal acumulado poderá ser lixiviado para outras localizações.

Há uma estimativa do aumento das áreas salinizadas a uma taxa de 10% ao ano, que apesar de ocorrer pelos fatores citados acima, podem ser agravadas por outros fatores, tais como: baixa precipitação, elevada evaporação da superfície e a utilização de práticas culturais pobres. Em regiões do semiárido brasileiro, essa situação torna-se crítica, haja vista que a maioria dessas condições ocorrem em conjunto. Na região Nordeste do Brasil, por exemplo, há pouco escoamento das águas de rios, devido a variabilidade temporal das precipitações e das características geológicas dominantes, como solos rasos (CIRILO, 2008).

De acordo com Jamil *et al.* (2011) a permanecer essas práticas inadequadas aproximadamente 50% das terras aráveis serão salinizadas até 2050. Isso é alarmante para a agricultura mundial, haja vista que nos próximos anos tende haver aumento da demanda por alimento, pois a perspectiva é de que haja um adicional de 2,3 bilhões de pessoas em todo o mundo até 2050 (FAO, 2013). Assim, as mudanças climáticas e a degradação dos solos poderão

trazer consequências socioeconômicas drásticas nos próximos anos. Portanto, há uma necessidade de procurar meios para reabilitar os solos salinos e difundir práticas adequadas entre os agricultores para diminuir a salinização, visto que muitas culturas poderão ser afetadas pela salinidade.

### **4.3 As plantas e a salinidade**

As plantas enfrentam variados tipos de estresses no ambiente, entre eles o estresse salino. E para enfrentar esse estresse, as plantas têm adquirido diferentes mecanismos adaptativos para controlar os impactos negativos da salinidade, os quais tem sido utilizado para classificá-las em dois grupos: as halófitas são plantas eficientes na adaptação e conseguem habitar ambientes salinos, já as glicófitas são plantas que não conseguem lidar com o solo salino e portanto excluídas desse ambiente (FLOWERS; TROKE; YEO, 1977; HASEGAWA *et al.*, 2000). A maioria das culturas comerciais são classificadas como glicófitas, em que os níveis de sais moderados a elevados, já são considerados prejudiciais, haja vista que podem afetar o seu desenvolvimento e crescimento.

A redução do crescimento pode ocorrer em duas fases, a primeira acontece de forma rápida e é atribuída ao efeito osmótico dos íons, e a segunda ocorre de forma mais lenta, sendo atribuída ao efeito específico do sal (MUNNS, 2005). Na primeira fase, as elevadas concentrações de sais dissolvidos na solução do solo reduzem seu potencial osmótico, e conseqüentemente seu potencial hídrico, tornando mais difícil a capacidade da absorção de água pela planta. Na segunda fase o efeito tóxico dos íons no interior da planta predomina. Por exemplo, nas folhas, o acúmulo de íons tóxicos pode exceder a capacidade de seu transporte para o vacúolo, e provocar injúria às suas células (MUNNS, 1993, 2002, 2005; LÄUCHLI; GRATAN, 2007). Contudo, as plantas podem acumular íons em níveis tóxicos, porém em suas folhas mais velhas que serão removidas pela abscisão foliar (MUNNS; TESTER, 2008). O crescimento também pode ser prejudicado pelo excesso de sais, pois pode ocorrer o desequilíbrio nutricional (ASHRAF, 2004), o qual é provocado pela absorção competitiva entre os nutrientes, pela interferência na disponibilidade de nutrientes, pelo seu transporte e distribuição no interior da planta.

As plantas conseguem modular alguns mecanismos para enfrentar o estresse salino, tais como: homeostase iônica (compartimentalização, transporte e absorção de íons), biossíntese de solutos compatíveis, ativação de enzimas antioxidantes, síntese de compostos antioxidante e modulação hormonal. A manutenção da homeostase iônica pela absorção de íons

e sua compartimentalização é vital para evitar grandes prejuízos às células. Para tanto, as membranas plasmáticas e seus componentes associados regulam a absorção e transporte de íons. Sabe-se que níveis elevados de  $K^+$  no citosol são essenciais para a atividade de enzimas e manutenção da turgidez da célula, e por essa razão o vacúolo serve de reservatório para o  $K^+$ . Esse íon é mantido dentro da célula através de transportadores de  $K^+$ , tais como NHX (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger*) no tonoplasto, e canais na membrana. O NHX funciona como um transportador antiporte do  $K^+/H^+$  sendo importante na tolerância ao sal. A célula tenta manter um baixo nível do  $Na^+$  no citosol, dessa maneira o  $Na^+$  é também transportado do citoplasma para o vacúolo através do NHX, que medeia o transporte do  $Na^+/H^+$  (APSE *et al.*, 1999). A força motriz que impulsiona o transporte vacuolar é proveniente das bombas  $H^+$ -ATPases e  $H^+$ -PPiases vacuolares (DIETZ *et al.*, 2001; OTOCH *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2001). No estresse salino, o  $Na^+$  compete com  $K^+$ , visto que compartilham o mesmo mecanismo de transporte, conduzindo, então, a uma reduzida absorção de  $K^+$  (MUNNS; TESTER, 2008; SAIRAM; TYAGI, 2004). Outro transportador muito importante para a absorção e transporte de sal, é o *SOS1* (*Salt Overly Sensitive*). O gene *SOS1* codifica um transportador antiporte  $Na^+/H^+$  na membrana plasmática, o qual é responsável pela exclusão do  $Na^+$  do citoplasma para o apoplasto (SHI *et al.* 2000). Na membrana plasmática há uma  $H^+$ -ATPase que é uma bomba primária, geradora de força próton motriz para a condução do transporte ativo do  $K^+$  e  $Na^+$  (SZE *et al.* 1999).

O equilíbrio osmótico é fundamental, pois sua ausência resulta na perda da turgescência, desidratação celular e até mesmo na morte das células. Logo, ajustar-se osmoticamente através da acumulação de solutos é importante para manter um gradiente para o influxo de água. Os solutos compatíveis em concentrações elevadas estão relacionados ao ajustamento osmótico. Esses solutos pertencem a grupos de compostos orgânicos diversos, que não interferem com o metabolismo celular. Entre eles pode-se citar: a prolina (HOQUE *et al.*, 2007; AHMAD *et al.*, 2010; HOSSAIN *et al.*, 2011; NOUNJAN *et al.*, 2012; TAHIR *et al.*, 2012), a glicina betaína (KHAN *et al.*, 2000; WANG; NII, 2000), açúcares (como sacarose e rafinose) (KEREPESI; GALIBA, 2000; BOHNERT *et al.*, 1995) e polióis (ASHRAF; FOOLAD, 2007; SAXENA; KAUR; VERMA, 2013).

A salinidade também afeta a fotossíntese, principalmente através da redução da área foliar, do teor de clorofila, da condutância estomática e em menor extensão, através da diminuição da eficiência do fotossistema II (NETONDO *et al.*, 2004). Sabe-se que o acúmulo de  $Na^+$  e/ou  $Cl^-$  nos cloroplastos, pode afetar as reações bioquímicas e fisiológicas (ASHRAF;

HARRIS, 2013), como o conteúdo de clorofila (ZHANG *et al.*, 2005). Por essa razão, a concentração de clorofila é muito utilizada como um indicador do estado metabólico celular (CHUTIPAIJIT *et al.* 2011). O estresse salino também pode levar ao fechamento dos estômatos, implicando na redução do CO<sub>2</sub> nas folhas e inibição da fixação de carbono. Isso, por sua vez, acaba expondo os cloroplastos a uma saturação/desequilíbrio da fase fotoquímica, aumentando a geração de EROS (PARIDA; DAS 2005; AHMAD; SHARMA 2008; AHMAD *et al.* 2010, 2011). As EROS provocam danos oxidativos em vários componentes celulares, tais como: proteínas, lipídios e DNA. E para controlar o balanço de EROS nas células, há a mobilização dos sistemas antioxidantes enzimático e não-enzimático que desempenham um papel crítico na desintoxicação de EROS. É necessário entender que o sistema antioxidante enzimático pode responder de forma diferenciada, dependendo do genótipo que enfrenta a condição de estresse salino, pois essas respostas envolvem a regulação da sua expressão gênica (KAUR *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016).

As variações genéticas na tolerância ao sal podem variar entre espécies de plantas, mas também entre variedades da mesma espécie. De acordo com Munns (2005) há genes que estão associados a tolerância ao sal, os quais são classificados em três grupos funcionais: 1) os que controlam a absorção e o transporte de sal, 2) os relacionados às funções osmóticas ou de proteção e 3) aqueles que atuam acelerando o crescimento no solo salino. Devido a essas variações genéticas e respostas diferenciais ao estresse salino, há muito para ser investigado, principalmente no conjunto de genes relacionados à função de proteção, assim como seus produtos gênicos.

#### **4.4 As principais espécies reativas de oxigênio**

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são formadas através da redução parcial do oxigênio em organismos aeróbicos. O oxigênio em seu estado fundamental é relativamente não reativo, possuindo dois elétrons desemparelhados com *spin* paralelos, localizados em diferentes orbitais. No entanto, quando recebem energia extra, devido a atividade metabólica normal ou como resultado de vários estresses ambientais, o O<sub>2</sub> é capaz de originar um estado reativo perigoso (POLIDOEROS *et al.*, 2005; PHANIENDRA *et al.*, 2015). Com a entrada de energia extra, há uma reversão no *spin* de um dos elétrons do oxigênio, gerando dois elétrons com *spin* antiparalelos, e ocasionando o aumento do poder de oxidação desse elemento (KRIEGER-LISZKAY, 2004). O resultado desse aumento é a formação do oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Outras EROS também são geradas pela transferência de um, dois ou três elétrons

formando o radical superóxido  $\cdot\text{O}_2^-$ , o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxil  $\cdot\text{OH}$  (MITTLER, 2002; AZEVEDO NETO; GOMES-FILHO; PRISCO, 2008; DEMIDCHIK, 2015).

Em condições normais, as EROS são produzidas incessantemente como subprodutos de vias metabólicas, porém em baixos níveis nas organelas. Contudo, sob condições de estresse salino há um favorecimento da fotorrespiração e a superredução da cadeia transportadora de elétrons, levando à produção de EROS (APEL; HIRT, 2004; NOCTOR *et al.*, 2014). Devido a sua alta reatividade e potencial para causar danos a estrutura celular, sob condições de desequilíbrio redox, a geração de EROS nas células é considerada prejudicial (LUSHCHAK, 2015).

Vários compartimentos subcelulares contribuem para a produção de EROS, tais como: cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Essas organelas são consideradas as principais produtoras de EROS (MITTLER *et al.*, 2004; ASADA, 2006). Em adição, as EROS também podem ser geradas na membrana plasmática e no apoplasto em resposta aos sinais endógenos e estímulo ambiental exógeno. Na membrana plasmática há atividade das proteínas pertencentes a família da NADPH oxidase (homóloga a uma oxidase da explosão respiratória, RBOH). NADPH oxidase é uma proteína de membrana integral, que promove a transferência dos elétrons do NADPH citoplasmático para o oxigênio extracelular, formando  $\cdot\text{O}_2^-$  e promovendo a acumulação de EROS no apoplasto (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014). Outras oxidases e peroxidases associadas às paredes celulares estão envolvidas na geração de EROS no apoplasto, tais como: amino-oxidases, poliamina-oxidase, oxalato-oxidase, bem como uma família das peroxidases de terceira classe (APEL; HIRT, 2004; COSIO; DUNAND, 2009; GIL; TUTEJA, 2010).

Os cloroplastos são importantes fontes de EROS durante uma condição de estresse. Quando a energia da luz absorvida excede a capacidade de uso para a fotossíntese, através dos transportadores de elétrons, há formação do radical superóxido  $\cdot\text{O}_2^-$  como um subproduto no fotossistema I e II (POSPISIL *et al.*, 2004; ASADA, 2006). Além do cloroplasto, o radical superóxido  $\cdot\text{O}_2^-$  pode ser produzido nas mitocôndrias (complexo I e II, da cadeia transportadora de elétrons), citosol, retículo endoplasmático, glioxissomos, peroxissomos e no apoplasto (MITTLER *et al.* 2004; FOYER; NOCTOR, 2005; DEMIDCHIK, 2015).

O radical hidroxil pode ser formado dentro dos cloroplastos, através da reação do superóxido e do peróxido de hidrogênio, na presença de íons metálicos solúveis, envolvendo a reação de Haber-Weiss (BOWLER *et al.*, 1992). As células não possuem mecanismos de

detoxificação enzimática para o  $\cdot\text{OH}$ . As plantas podem minimizar o dano induzido por esse radical livre, como acontece na membrana das células, pela prevenção da sua formação ou pela detoxificação por antioxidantes não-enzimáticos (RODRIGO-MORENO *et al.*, 2013).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser gerado principalmente nos peroxissomos através das enzimas: glicolato oxidase e acil-CoA-oxidase, que estão envolvidas na fotorespiração, e  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos (DEL RIO, 2015). A produção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  na fotorrespiração é considerada fonte oxidante mais significativa, sob condições de luz em plantas C3 (NOCTOR *et al.*, 2002; FOYER; NOCTOR, 2003). Ele também pode ser produzido durante a dismutação espontânea do  $\cdot\text{O}_2^-$  e através da ação catalítica da SOD. As mitocôndrias e os cloroplastos também são fontes que geram  $\text{H}_2\text{O}_2$ , durante diferentes reações oxidativas e de transporte de elétrons (ASADA, 2006; DEL RÍO *et al.*, 2006; RHOADS *et al.*, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; DEL RÍO; PUPPO, 2009; DEL RÍO, 2013). As peroxidases ligadas na parede celular também podem gerar  $\text{H}_2\text{O}_2$  (BOLWELL; DAUDI, 2009; O'BRIEN *et al.*, 2012).

Apesar da toxicidade das EROS, essas espécies podem desempenhar um papel chave como moléculas sinalizadoras, regulando diversas vias, incluindo respostas a estresse (BAXTER *et al.*, 2014) e ao crescimento e desenvolvimento (APEL; HIRT, 2004; MITTLER *et al.*, 2004). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  destaca-se na sinalização, como observado por Sathiyaraj *et al.* (2014), em *Panax ginseng*, que ao ser pré-tratada com peróxido de hidrogênio e submetida ao estresse salino, tornou-se mais tolerante aos efeitos deletérios da salinidade, devido a ação do sistema enzimático antioxidante e da redução do conteúdo do malondialdeído (MDA).

A evolução dos processos metabólicos aeróbicos inevitavelmente levou à produção de EROS nas plantas. Elas são produzidas em baixos níveis, e em diversos locais da célula durante seu desenvolvimento e crescimento normal. No entanto, diante de mudanças ambientais que geram estresse, seus níveis se elevam muito e geram a chamada explosão oxidativa, causando sérios danos em proteínas, lipídios e ácido nucléico, resultando em dano e até morte celular (GILL; TUTEJA, 2010). Por isso, as plantas desenvolveram um eficiente sistema antioxidante que permite controlar os níveis de EROS e prevenir os efeitos deletérios sobre as biomoléculas na célula.

#### **4.5 Sistema antioxidante enzimático**

As plantas desenvolveram eficientes sistemas antioxidantes (enzimático e não-enzimático) para manter o balanço entre a produção e a eliminação de EROS a nível



intracelular. Com isso, as plantas evitam o potencial dano causado pelas EROS aos componentes celulares, ao mesmo tempo que mantêm certos níveis para a transdução do sinal.

O sistema antioxidante não-enzimático é constituído pelo ascorbato (AsA), a glutathiona (GSH), o tocoferol, os carotenóides e os compostos fenólicos (GILL; TUTEJA, 2010). Já o sistema antioxidante enzimático é constituído pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPX), guaicol peroxidase (GPOX), peroxirredoxina (PRX), ascorbato peroxidase (APX), monodesidroascorbato redutase (MDHAR), desidroascorbato redutase (DHAR) e glutathiona redutase (GR) (ASADA, 1999; MITTLER, 2002; MITTLER *et al.*, 2004). A presença dessas enzimas antioxidantes em vários compartimentos celulares sugere a importância na detoxificação dentro da célula (MITTLER *et al.*, 2004). Nesse tocante, a maioria das investigações sobre a relação entre EROS e a tolerância a salinidade vem sendo direcionada para as enzimas antioxidantes, embora o sistema não-enzimático desempenhe um papel importante para aliviar o excesso de EROS (BOSE; RODRIGO-MORENO; SHABALA, 2014). A SOD, a CAT e a APX destacam-se entre as enzimas antioxidantes, visto que estão relacionadas com a tolerância ao estresse salino (SOFO *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2014b).

A SOD é uma metaloenzima que está presente em todos os organismos aeróbicos. Ela catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio constituindo a primeira linha de defesa da célula (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). Com base no seu cofator metálico e sítio ativo, as isoenzimas da SOD são classificadas em três principais grupos: 1) Fe-SOD, localizada predominantemente no cloroplasto e, em alguma extensão, nos peroxissomos e apoplasto; 2) Mn-SOD, localizada nas mitocôndrias e peroxissomos; e 3) Cu/Zn-SOD localizada no citosol, cloroplastos e peroxissomos (CORPAS *et al.*, 2006). Ashraf (2009), sugere ainda a existência de outra SOD, na qual o íon metálico no seu sítio ativo é o Ni. Dessa maneira, a distribuição diversificada das SODs demonstra a importância para a detoxificação do superóxido nas células (ALSCHER *et al.*, 2002). Todas as isoformas da SOD (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD) são codificadas pelo núcleo, traduzidas no citoplasma e transportadas para suas organelas por meio das sequências N-terminal (PAN *et al.*, 2006). As Cu /Zn-SODs são as mais abundantes na planta, e a sensibilidade da Cu / Zn-SOD citosólica para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é maior do que a Cu / Zn SOD do cloroplasto (BAUM *et al* 1983; KWIATOWSKI; KANIUGA 1986). Ela pode ser inibida pelo cianeto de potássio (KCN) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ALSCHER *et al.*, 2002). Já a Fe-SOD é resistente ao KCN, mas é inativada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ALSCHER *et al.*,

2002). A Fe-SOD protege o cloroplasto contra o estresse oxidativo, e é considerada essencial para o desenvolvimento do cloroplasto em *Arabidopsis* (MYOUGA *et al.* 2008).

A SOD, além de participar da eliminação do superóxido gerado durante o metabolismo aeróbico, também é considerada importante na tolerância ao estresse abiótico. De acordo com Zhang *et al.*, (2014b), em estudos com cultivares de algodão contrastantes em relação a tolerância à salinidade, observaram que o cultivar mais tolerante apresentava maior atividade da SOD do que o cultivar mais sensível, tanto em folha quanto em raiz.

As diferentes isoformas de SOD podem apresentar atividade diferencial durante a adaptação ao estresse (ALSCHER *et al.*, 2002; JITHESH *et al.*, 2006). Segundo Pan *et al.* (2006), em plantas de *Uralensis glycyrrhiza* submetidas ao estresse salino verificou-se que, entre as três isoformas Mn-SOD, Cu/Zn-SOD e Fe-SOD, a atividade foi aumentada na primeira, diminuída na segunda e variável na última. Para Talukdar (2013), a participação das isoformas da SOD em diferentes compartimentos celulares reduz os radicais livres produzidos pelo estresse salino. Outros autores, como Liu *et al.* (2015), observaram que a superexpressão em *Arabidopsis* de um gene da SOD de *Jatropha curcas* (JcCu/Zn-SOD) conferiu tolerância ao estresse salino. As plantas tiveram maior crescimento da raiz, maior número de folhas e aumento da atividade da SOD durante o estresse salino. É necessário compreender que há consideráveis variações na atividade da SOD em resposta ao estresse salino, tanto entre espécies quanto dentro da mesma espécie. Em certos casos, a perda da capacidade de detoxificar os radicais livres durante o estresse têm sido atribuída a uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes (MITTOVA *et al.* 2002; DESINGH; KANAGARAJ 2007).

Uma vez que a SOD, durante um estresse abiótico, tenha conseguido catalisar a reação de dismutação do superóxido, ela gera peróxido de hidrogênio, que é tóxico. Como a tolerância ao estresse abiótico é um processo multigênico, além da mudança na expressão de SOD pode haver mudança na cascata de expressão de outras enzimas, associadas com a resistência ao estresse (MCKERSIE *et al.*, 1999). Nas plantas, as enzimas CAT e APX são algumas das principais reguladoras dos níveis intracelulares do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (FOYER; NOCTOR, 2003).

A CAT é uma enzima tetramérica que contém um grupo prostético heme em cada subunidade (REGELSBERGER *et al.*, 2002). Ela possui a capacidade de converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. Ela possui uma das maiores taxas de renovação de todas as enzimas, pois ela consegue converter 6 milhões de moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigênio por minuto. As isoenzimas de CAT, dependendo de sua localização podem ser

classificados em três classes: 1) as que são mais proeminentes nos tecidos fotossintéticos e estão envolvidas na remoção do  $H_2O_2$  produzido durante a fotorrespiração; 2) as que são produzidas em grande quantidade em tecidos vasculares e podem desempenhar um papel na lignificação; e 3) as que são muito abundantes em sementes e tecido reprodutivo, e podem estar envolvidas na remoção do  $H_2O_2$  produzido durante a degradação excessiva de ácido graxo no ciclo do glioxilato nos glioxissomos (WILLEKENS *et al.*, 1995).

Algumas angiospermas, como o milho, tabaco, *Arabidopsis*, abóbora e arroz apresentam três genes da catalase (WILLEKENS *et al.*, 1995; FRUGOLI *et al.*, 1996; GUAN; SCANDALIOS, 1996; ESAKA *et al.*, 1997; IWAMOTO *et al.*, 2000). Os genes das catalases respondem diferencialmente a várias condições de estresses (SCANDALIOS, 2002; 2005), sendo considerados indispensáveis para desintoxicação de EROS (VAN BREUSEGEM *et al.*, 2001). Gondim *et al.* (2012), avaliando o efeito do pré-tratamento com  $H_2O_2$  em plantas de milho submetidas ao estresse salino, perceberam que a aplicação foliar de  $H_2O_2$  aumentou a atividade antioxidante enzimática, especialmente da CAT.

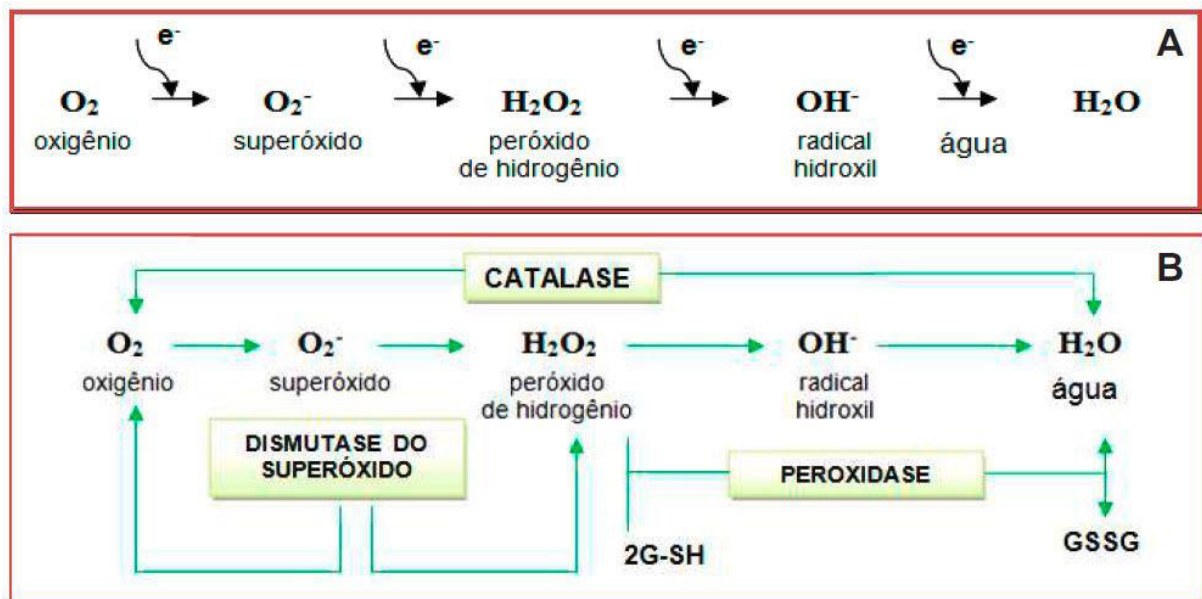
A APX é uma heme-peroxidase de classe I, sendo largamente distribuída no reino vegetal. Ela tem maior afinidade pelo  $H_2O_2$  e catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em água, usando o ascorbato (AsA) como doador de elétrons. As APXs são lábeis na ausência de do ascorbato, logo um elevado nível endógeno deste é requerido para manter o sistema antioxidante (ASADA, 1992; SHIGEOKA *et al.*, 2002). As diferentes isoformas são classificadas de acordo com a sua localização subcelular. As isoformas solúveis são encontradas no citosol, mitocôndria, e estroma do cloroplasto, enquanto aquelas ligadas a membrana são encontradas em microcorpos (incluindo peroxissoma e glioxissoma) e tilacóides do cloroplasto (SHIGEOKA *et al.*, 2002). A alteração na quantidade de uma isoforma particular de qualquer enzima antioxidante pode ser mais benéfica ao metabolismo antioxidante, do que mudanças na atividade total, devido a atividade dessa isoforma ser específica a proteção de um compartimento celular.

As isoenzimas de APX são codificadas por uma pequena família de genes (PASSARDI *et al.*, 2007). Por exemplo, por exemplo em caupi foram encontrados quatro membros, estando a proteína presente na forma citosólica, peroxissomal e no cloroplasto (tilacóide e estroma) (D'ARCY-LAMETA *et al.*, 2006). Em plantas a expressão dos genes que codificam para a APX é modulada por vários estresses abióticos (ROSA *et al.*, 2010; BONIFÁCIO *et al.*, 2011 CAVERZAN *et al.*, 2012; CAVERZAN *et al.*, 2014), além de depender do estágio de desenvolvimento e do tecido (AGRAWAL *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et*

*al.*, 2006). O estudo da expressão dos genes envolvendo alterações na atividade da APX, pode fornecer conhecimento, acerca de uma regulação molecular de plantas durante um estresse, como o salino. Guan *et al.* (2015) verificaram que a superexpressão do gene da APX de *Pulcinellia tenuiflora* (*PutAPX*) em *Arabidopsis* aumentava a tolerância das plantas de *Arabidopsis* ao tratamento salino. Teixeira *et al.* (2006) relataram que os três genes da APX em arroz (*OsAPX2*, *OsAPX7* e *OsAPX8*) apresentaram alterações nos níveis dos transcritos, em resposta ao estresse salino. Enquanto que as expressões de APX2 e APX7 foram aumentadas, a expressão de APX8 foi fortemente diminuída. Em outro estudo, plantas de arroz silenciadas para APX citosólica revelaram mecanismos compensatórios envolvendo a expressão e a atividade de outras enzimas antioxidantes, como: CAT e GPX (BONIFÁCIO *et al.*, 2011).

Em conjunto, esses estudos evidenciam que o estresse salino provoca alterações no padrão de transcrição e atividade de enzimas antioxidantes, para tentar regular a homeostase em cada compartimento celular. A extensão do estresse oxidativo nas células é determinada pela quantidade do superóxido, do peróxido de hidrogênio, bem como do radical hidroxil presente nas células (Figura 1A). E por essa razão, alguns autores têm ressaltado a importância da coordenação entre as atividades da SOD, CAT e APX nos processos de remoção de EROS (Figura 1B), e sua relação na tolerância à salinidade (MITTOVA *et al.*, 2003; MELONI *et al.*, 2003; AZEVEDO NETO *et al.*, 2006). O balanço das atividades da SOD, APX e CAT é crucial para as células, pois a alteração do equilíbrio das enzimas antioxidantes poderá induzir outros mecanismos compensatórios de proteção à célula (APEL; HIRT, 2004; SCANDALIOS, 2002; 2005). Em adição ao mecanismo antioxidante, as plantas têm desenvolvido vias para evitar a produção de formas tóxicas do oxigênio. Esses mecanismos incluem adaptações anatômicas, tal como movimento, enrolamento foliar, modulação do fotossistema e do complexo antena (MAXWELL *et al.*, 1999; MITTLER, 2002). Em adição, prevenindo o excesso de EROS, por divergir o fluxo dos elétrons através da cadeia transportadora mitocondrial, existe uma oxidase alternativa (AOX) (MAXWELL *et al.*, 1999), diminuindo a possibilidade do vazamento dos elétrons do O<sub>2</sub>, para gerar  $\cdot\text{O}_2^-$ .

A geração de EROS é considerada um resultado indispensável do metabolismo aeróbio, e, portanto, as plantas desenvolveram e orquestram um conjunto de mecanismos, como especialmente o sistema antioxidante enzimático na tentativa de desintoxicar à célula das EROS. Nos últimos anos, estudos tem revelado um outro papel para as EROS, elas podem atuar como moléculas de sinalização na ativação de respostas de defesas (GILL; TUTEJA, 2010; GUPTA *et al.*, 2013a; PÁL *et al.*, 2015; SAHA *et al.*, 2015).



**Figura 1** - Formação das espécies reativas de oxigênio (A), e atuação do complexo enzimático antioxidante (B)  
Fonte: (APPEL; HIRT, 2004).

#### 4.6 O peróxido de hidrogênio como molécula sinalizadora

As plantas desenvolveram mecanismos para reconhecer sinais externos, os quais permitem que eles reajam às diferentes condições ambientais. Para tanto, o sinal externo precisa ser repassado adequadamente para o interior da célula para poder modificar vias metabólicas relacionadas à tolerância a determinado estresse ambiental. Portanto, a habilidade da planta para sobreviver depende da propagação desse sinal, e das respostas disparadas pelas suas vias de sinalização.

O repasse do sinal celular pode ocorrer através de um sinal químico. Ele é um dos tipos mais importantes e estudados em plantas, podendo propagar-se à curta e a longa distância. Entre as moléculas que cumprem essa função, destaca-se as espécies reativas de oxigênio (EROS) que podem atuar a longa distância através da propagação célula a célula (MILLER *et al.*, 2009; MITTLER *et al.*, 2011). Elas atuam em níveis baixos regulando uma variedade de processos, como: alongação celular, diferenciação, morfogênese e respostas ao estresse ambiental (DAT *et al.*, 2000; FOREMAN *et al.*, 2003; TSUKAGOSHI *et al.*, 2010; BHATTACHARJEE, 2012).

Entre as EROS, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) destaca-se por ser um dos mais estável por apresentar longa meia vida celular (1 ms). Além disso, ele apresenta tamanho reduzido o que lhe permite difundir-se através de membranas biológicas e migrar para

diferentes compartimentos, facilitando a função de sinalização (APEL; HIRT, 2004; BIENERT *et al.*, 2006; MARUTA *et al.*, 2012; NOCTOR *et al.*, 2014). Ele é transportado nas membranas celulares através de canais transportadores de água, como as aquaporinas (BIENERT; SCHJOERRING; JAHN, 2006). Em conjunto, todas essas características fazem o peróxido de hidrogênio adequado para a sinalização. Neste tocante, já é estabelecido o papel de sinalização do peróxido de hidrogênio nos processos da aclimação ao estresse, defesa antioxidante, ligação cruzada com a parede celular, comportamento estomático, produção das fitoalexinas, regulação do ciclo celular e fotossíntese (HOSSAIN *et al.*, 2015).

Nas plantas o  $H_2O_2$  pode ser produzido por diversas fontes, ou mesmo durante uma explosão oxidativa associada a resposta de hipersensibilidade a algum patógeno (MILLER *et al.*, 2010). É importante salientar que uma vez que os níveis de  $H_2O_2$  estejam excedidos, a planta aciona seu sistema antioxidante, fato esse que permite somente as plantas suportar níveis maiores de  $H_2O_2$  do que outros organismos, para regular os seus níveis produzidos na célula. O balanço entre produção e decomposição do  $H_2O_2$  ocorre de forma integrada, sendo responsável pelo seu efeito biológico na planta. Para Petrov e Van Bresusegem (2012), os efeitos biológicos do  $H_2O_2$  são dependentes não apenas da sua concentração, mas do seu local de produção, do estágio de desenvolvimento e da prévia exposição da planta a outros tipos de estresse. Por exemplo, o  $H_2O_2$  produzido no cloroplasto está envolvido nas respostas de sinalização precoce, tal como a ativação de fatores de transcrição e genes da biossíntese de mensageiros secundários, e o produzido no peroxissomo está envolvido na regulação dos genes envolvidos em vias de reparação de proteínas (SEWELAM *et al.*, 2014).

O  $H_2O_2$  pode atuar como uma molécula de sinalização via reação química, sendo capaz de reagir com aminoácidos específicos, levando a modificações de peptídeos ou proteínas. Nesse contexto, o  $H_2O_2$  pode oxidar as metioninas presentes em proteínas, que estando associadas a percepção do sinal oxidativo pode levar uma mudança no estado de fosforilação, e alteração na atividade enzimática (HARDIN *et al.* 2009). Além disso, o  $H_2O_2$  também reage com a glutathiona (GSH) e proteínas contendo resíduos de cisteína, sendo esse último o alvo mais sensível para modificação pós-traducional mediada por ROS. Essas proteínas que contêm esses resíduos de cisteína podem ser usadas como sensores redox em vias de transdução de sinal (COUTURIER *et al.*, 2013). Além dessas proteínas, os fatores de transcrição do estresse térmico (Hsfs) também funcionam como sensores redox dependentes de ROS, estando localizados no citosol e no núcleo. Hsfs modulado por EROS, pode agir regulando a transcrição dos genes que codificam as peroxidases citosólicas, como a APX1 e

APX2 (MAZARS *et al.*, 2009). Há evidências que alguns Hsfs sentem as EROS e controlam as expressões gênicas durante o estresse oxidativo (MILLER; MITTLER, 2006).

A sinalização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece ser integrada com diferentes redes de sinalização em plantas, como: a rede das proteínas quinases, a sinalização do Ca<sup>+2</sup> e a rede dos metabólicos celulares. A acumulação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode preceder a sinalização, e em outros casos a acumulação pode ser consequência da sinalização. As proteínas quinases dependente do cálcio (CDPKs) e as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) são componentes fundamentais para o início da transdução do sinal. As cascatas das MAPK são importantes vias nas respostas ao estresse abiótico, e permitem que o estímulo extracelular seja traduzido a uma mudança intracelular (ZOU *et al.*, 2014). Há estímulos celulares que induzem a produção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e também ativam as vias das MAPK em vários tipos de células (MCCUBREY *et al.*, 2006). As MAPK responsivas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são MAPK1, MAPK4 e MAPK6, as quais podem permanecer ativas durante o estresse oxidativo e na regulação redox das respostas ao estresse ambiental. Segundo Pan *et al.*, 2012, a aplicação exógena do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em *Arabidopsis thaliana* pode ativar a cascata da MAPK, que regula a produção de EROS e o processo de detoxificação celular.

Um dos principais alvos da sinalização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é a regulação da homeostase do cálcio (PETROV; VAN BREUSEGEM, 2012), o qual é um dos principais mensageiros secundários na rede de sinalização do estresse abiótico (WEI *et al.*, 2014). Lu *et al.* (2013) sugerem que a aplicação exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Ca<sup>+2</sup> pode mediar o fluxo de íon na raiz em espécies de mangue sob condições de estresse salino. Um dos processos mais conhecidos que envolve a sinalização do Ca<sup>+2</sup> mediada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é a regulação das células guarda durante a abertura dos estômatos (YOUNG *et al.*, 2006). Além disso a homeostase do Ca<sup>+2</sup> regula a defesa antioxidante em plantas. Quando os níveis intracelulares do Ca<sup>+2</sup> aumentam causa uma eficiente desintoxicação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois envolve o aumento dos níveis das enzimas antioxidantes, como a CAT3, que é sensível ao Ca<sup>+2</sup>. Em plantas, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> também interage com o Ca<sup>+2</sup>, o ácido abscísico (ABA) e o óxido nítrico (NO), e juntos formam uma rede de sinalização para regular diferentes processos fisiológicos e de desenvolvimento (NIU; LIAO, 2016). A interação entre eles também tem um efeito sobre as respostas ao estresse abiótico, como foi relatada por Lang *et al.* (2014) em *Aegiceras corniculatum*, como o aumento do sistema antiporte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> na membrana plasmática durante o estresse salino. Assim como o cálcio, os fatores de transcrição (TFs) são largamente envolvidos na modulação dos genes relacionados às EROS que ajudam nas respostas ao estresse abiótico, como os fatores de transcrição WRKY (MITTLER *et al.*, 2011).

Nesse contexto, percebe-se que o  $H_2O_2$  está presente e interconectado a diferentes vias de sinalização, modulando a expressão gênica a uma variedade de estímulos de estresse (BOWLER; FLUHR, 2000). A modulação da expressão gênica, envolvendo o controle de EROS, transdução de sinal, regulação transcricional e metabolismo das proteínas, carboidratos e lipídeos revelam a complexidade das respostas transcricionais para o  $H_2O_2$  (LI *et al.*, 2011). Um grande número de genes envolvidos na percepção do estresse, transdução do sinal, transcrição, defesa e metabolismo em geral tem sido identificado, revelando alta dinâmica, e uma redundância na rede de genes associados com enzimas envolvidas na produção e decomposição de EROS. Os genes que codificam enzimas antioxidantes são componentes centrais nesta rede, e seu funcionamento tem efeito profundo no controle do excesso de EROS e no balanço redox da célula. As EROS podem regular negativamente a expressão dos genes que codificam enzimas antioxidantes, fornecendo um mecanismo de feedback que pode regular os níveis de EROS, sendo importante na modulação da rede de sinalização (MYLONA; POLIDOEROS, 2010). O  $H_2O_2$  funciona como uma das principais moléculas na sinalização de estresse em planta. Por exemplo, em *Arabidopsis thaliana*, a expressão de 1-2% dos seus genes é dependente do  $H_2O_2$  (DESIKAN *et al.*, 2001). Os estudos desses genes revelam que o aumento do  $H_2O_2$  tem impacto sobre o transcriptoma de todas as espécies de plantas, e que eles estão envolvidos, por exemplo, na produção das enzimas antioxidantes.

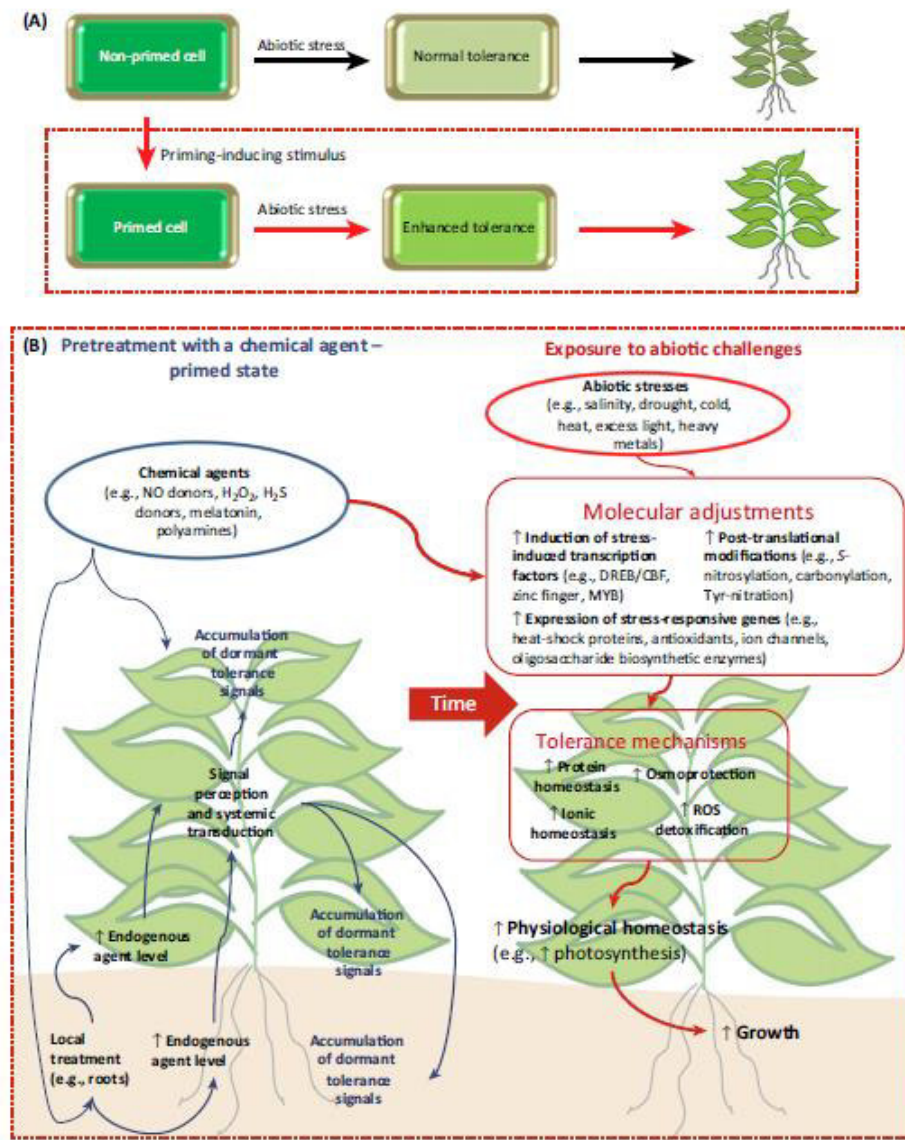
O peróxido de hidrogênio possui características adequadas para ser um mensageiro secundário, pois tem o potencial de carregar informação entre diferentes compartimentos, e é facilmente regulada por muitos estímulos. Ele é hábil para modular a atividade de outros componentes de sinalização, e intercalar com cascatas de sinalização com diferentes resultados biológicos, incluindo os que levam à sua própria síntese (PETROV; VAN BREUSEGEM, 2012). Por isso, o papel do  $H_2O_2$  está relacionado com a regulação de diversos mecanismos, sob condições de estresse abióticos e bióticos (OROZCO-CÁRDENAS *et al.*, 2001; MALOLEPSZA; RÓZŸALSKA, 2005).

#### **4.7 O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio**

Diferentes metodologias têm sido empregadas para aumentar à tolerância aos estresses abióticos em plantas, uma delas consiste em realizar um pré-tratamento em plantas ou sementes através da exposição de um componente natural ou químico, levando a um estado de estresse suave, e fazendo delas mais tolerantes para um evento de estresse posterior, (Figura 2A). Um dos componentes químicos que pode causar esse evento, é o  $H_2O_2$ . É sugerido que



moléculas de sinalização ou proteínas envolvidas em sua síntese são acumuladas durante esse pré- tratamento, e essas moléculas seriam recrutadas em um estresse posterior de forma mais rápida e forte (Figura 2B) (SAVVIDES *et al.*, 2016). Há estudos relatando a utilização do  $H_2O_2$  em plantas com a tolerância a diferentes tipos de estresse abiótico, como metal pesado (CHAO *et al.*, 2009), térmico (WANG *et al.*, 2010, 2014), salino (GONDIM *et al.*, 2012) e hídrico (HOSSAIN; FUJITA, 2013).



**Figura 2** - (A) Pré-tratamento utilizando um agente químico resultando no aumento da tolerância. (B) Agente químico aplicado em um órgão que leva à ativação de vias de sinalização e acumulação de sinais de tolerância dormentes (Fonte: SAVVIDES *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, alguns trabalhos têm sido realizados com a aplicação exógena do  $H_2O_2$  em diferentes partes da planta, a fim de conferir tolerância ao estresse salino. Como relatam Fedina *et al.* (2009), o pré-tratamento com  $H_2O_2$  (1 e 5 mM) em plantas de *Hordeum*

*vulgare* seguida a submissão ao estresse salino (150 mM) por 4 e 7 dias, resultou no aumento das taxas de fixação de CO<sub>2</sub>, menor conteúdo do malondialdeído (MDA), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de Cl<sup>-</sup>. Segundo Li *et al.* (2011) quando plantas de trigo foram submetidas a aplicação exógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,05 μM) e posteriormente ao estresse salino, elas reduziram o conteúdo do MDA e aumentou o conteúdo de GSH e as atividades das enzimas APX, CAT, SOD e POD. Similarmente, Gondim *et al.* (2012) observaram que a aplicação foliar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi capaz de mitigar efeitos do estresse salino em plantas de milho, e que especialmente o sistema antioxidante enzimático ajudou na aclimatação ao estresse. A CAT foi a enzima mais responsiva com maior atividade observada (48 h) depois da aplicação, ademais o baixo conteúdo de MDA também foi observado para plantas com alta atividade da CAT. Ashfaque *et al.* (2014) observaram que plantas de trigo pré-tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 ou 100 μM) e submetidas ao estresse salino foram capazes de reduzir o conteúdo do Cl<sup>-</sup> e Na<sup>+</sup>, além de ter o aumentado o conteúdo da prolina e de N assimilados.

Em conjunto, esses estudos revelaram que o pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tem o potencial de induzir a tolerância à salinidade, pela modulação de diversos processos metabólicos. Além disso, alguns estudos têm sido direcionados através da abordagem proteômica onde observa-se modificações em proteínas em resposta ao pré-tratamento.

#### **4.8 Proteômica vegetal**

A proteômica pode ser definida como o conjunto de metodologias analíticas, sistemáticas, empregadas para caracterizar quantitativamente e/ou qualitativamente um proteoma (PANDEY; MANN, 2000; ONG; MANN, 2005). O termo proteoma descreve as proteínas expressas por um organismo em determinado período de desenvolvimento e condição ambiental e inclui suas isoformas e modificações pós-traducionais (WILKINS *et al.*, 1996; WILKINS *et al.*, 1996b; DE HOOG; MANN, 2004).

Nos últimos anos houve um aumento dos estudos proteômicos em espécies vegetais, especialmente os relacionados à proteômica descritiva; proteômica de organelas; proteômica das modificações pós-traducionais; e proteômica da expressão diferencial (respostas a estresses; sinalização; embriogênese, maturação de sementes e germinação) (JORRÍN NOVO *et al.*, 2009). Na investigação proteômica para as respostas aos estresses em vegetais, destacam-se os estudos com o estresse o salino (SOBHANIAN; AGHAEI; KOMATSU; 2011; LIU *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2015; JI *et al.*, 2016). Estes estudos podem permitir identificar as proteínas vegetais que desempenham funções essenciais na aclimatação

da planta, como as proteínas que funciona como moléculas anti-estresse (QURESHI *et al.*, 2007).

As plantas ao se aclimatarem a um determinado estresse, desencadeiam uma cascata de eventos, que se iniciam com a percepção do estresse e terminam com a expressão de diversos genes específicos (PASTORI; FOYER, 2002). É necessário compreender que esses genes ativados durante a exposição a determinado estresse, também podem ser responsivos a outro tipo de estresse (FOOLAD *et al.*, 2003; JISHA; VIJAYAKUMARI; PUTHUR, 2013). Portanto, as plantas são capazes de se adaptarem ou aclimatarem a uma gama de diferentes estresses, após exposição a um estresse específico, e esse evento é conhecido como tolerância cruzada (PASTORI; FOYER, 2002). Há pouca investigação sobre as mudanças que ocorrem no proteoma, quando plantas são submetidas a uma aplicação prévia com peróxido de hidrogênio e submetidas ao estresse salino. Nesse contexto, o estudo proteômico com plantas de feijão-de-corda que foram pulverizadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ajudar a compreender as principais respostas relacionadas a resistência ao estresse salino.

O estudo do proteoma vegetal através da eletroforese bidimensional, com a espectrometria de massas, e os avanços nas técnicas de biologia molecular impulsionam os estudos proteômicos para as respostas das plantas aos estresses abióticos (GRAVES; HAYSTEAD, 2002; ZHU *et al.*, 2003; DE HOOG; MANN, 2004; CHAMPAGNE; BOUTRY, 2013). A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) permite a separação, detecção e quantificação de proteínas presentes em amostras. Isso ocorre inicialmente pela separação das proteínas pelo ponto isoelétrico e pela massa molecular na segunda dimensão. Após a confecção de mapas proteicos bidimensionais, eles podem ser analisados através de softwares para a análise de imagens. A partir disso, apenas as proteínas que apresentem alterações significativas reprodutíveis são selecionadas para a identificação por espectrometria de massas (ROGOWSKA-WRZESINSKA *et al.*, 2013). A espectrometria de massas apresenta acurado grau de sensibilidade, em combinação com a rapidez da análise, em identificar a massa molecular, a partir da razão entre a massa e a carga das moléculas ionizadas (m/z) (DASS, 2001; CUNHA *et al.*, 2006). O espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector. Um dos métodos de ionização de massas que pode ser utilizado é o ESI (ionização por eletrodispersão). Os principais analisadores de massas associados a estas técnicas são o tempo de voo (TOF), o quadripolo e o aprisionamento de íons (IT) (CUNHA *et al.*, 2006).

Na identificação das proteínas, programas interpretam os espectros de fragmentação das proteínas e convertem essas informações em massas de peptídeos (SHEVCHENKO *et al.*, 2001). As massas de peptídeos obtidas funcionam como uma espécie de impressão digital (*peptide mass fingerprint*). Neste sentido existem programas, como o MASCOT (MANN *et al.*, 2001), para ajudar na busca de sequência em bancos de dados, como o SWISSPROT e NCBI. A utilização de bancos de dados transcricionais (*ESTs*) também tem auxiliado com grande importância o estudo de proteomas.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da aplicação foliar com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] expostas ao estresse salino, analisando as modificações fisiológicas, bioquímicas e moleculares.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração de  $H_2O_2$  exógeno capaz de induzir aclimação do cultivar TVu ao estresse salino (NaCl 80 mM), através da análise de parâmetros fisiológicos (área foliar, massa seca da parte aérea e raiz);
- Analisar a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX) em folhas;
- Determinar a peroxidação de lipídios em folhas;
- Elaborar mapas proteômicos reprodutíveis para tecidos foliares, avaliando as alterações nos mapas proteicos bidimensionais, durante a aplicação foliar do  $H_2O_2$  e/ou submissão das plantas ao estresse salino;
- Analisar, identificar e comparar as proteínas diferencialmente expressas nos tecidos foliares, durante a aplicação foliar do  $H_2O_2$  e/ou submissão das plantas ao estresse salino;
- Discutir a importância entre as proteínas identificadas durante a aplicação foliar do  $H_2O_2$  e/ou submissão das plantas ao estresse salino para o processo de aclimação.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Experimento I – Escolha da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adequada para o pré-tratamento das plantas de feijão

### 6.2 Material vegetal

Na condução dos experimentos foram utilizadas sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivar TVu 2331, provenientes do Banco de Germoplasma do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará (UFC). Neste trabalho foi escolhido um cultivar de feijão-de-corda susceptível ao estresse salino para que ele se tornasse uma alternativa para o agricultor, uma vez que o pré-tratamento foliar com peróxido de hidrogênio reduzisse os efeitos deletérios da salinidade.

#### 6.2.1 Semeadura, condições de cultivo e tratamentos

As sementes livres de danos mecânicos aparentes foram selecionadas e esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 1%, durante cinco minutos, visando eliminar possíveis patógenos presentes em seu tegumento. Em seguida, após várias lavagens, as sementes foram embebidas em água destilada durante duas horas. Depois disso, elas foram semeadas em copos plásticos, contendo vermiculita, sendo irrigadas com água destilada diariamente em condições de casa de vegetação. Após sete dias da semeadura, plântulas de tamanho uniforme foram transferidas para recipientes de plásticos, contendo 10 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), diluída 1:2. As plântulas foram monitoradas diariamente para manutenção adequada da aeração, dos níveis de solução nutritiva e do pH a 5,5. As trocas de soluções foram efetuadas a cada três dias para evitar restrições de nutrientes. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação com temperaturas médias de 28,3 °C, umidade relativa do ar média de 75 % e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 1200  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ .

Após quatro dias do processo de aclimação, as plântulas foram pulverizadas nas folhas com água destilada ou solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações de (1, 5, 10, 25, 50 e 100 mM). A solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tinha Tween 20 a 0,025% para facilitar a quebra da tensão superficial e a penetração do peróxido de hidrogênio. Após 24 horas, todas as pulverizações foram repetidas. No dia seguinte, as plântulas foram transferidas para vasos de 3 L e submetidas ao tratamento com NaCl a 80 mM, sendo a adição realizada de forma parcial, com NaCl a 40 mM/dia. Desta forma, ao final obtivemos os seguintes tratamentos conforme tabela 1.

**Tabela 1** - Pré-tratamento realizado sobre as folhas de feijão-de-corda com água destilada ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100 mM) e tratamento adicionado à solução nutritiva (NaCl 80 mM) ou nenhum.

<b>Pré-tratamento realizado nas folhas</b>	<b>Tratamento adicionado à solução nutritiva</b>	<b>Tipos de tratamentos realizados</b>
Pulverização com água destilada	Nenhum	Água/ controle
Pulverização com água destilada	NaCl (80 mM)	Água/ salino
Pulverização com peróxido de hidrogênio (1 mM)	NaCl (80 mM)	1 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / salino
Pulverização com peróxido de hidrogênio (5 mM)	NaCl (80 mM)	5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / salino
Pulverização com peróxido de hidrogênio (10 mM)	NaCl (80 mM)	10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / salino
Pulverização com peróxido de hidrogênio (25 mM)	NaCl (80 mM)	25 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / salino
Pulverização com peróxido de hidrogênio (50 mM)	NaCl (80 mM)	50 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / salino
Pulverização com peróxido de hidrogênio (100 mM)	NaCl (80 mM)	100 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / salino

### **6.2.2 Coleta de material vegetal para as análises fisiológicas**

As coletas de folhas, caules e raízes foram realizadas 240 h após a última pulverização do peróxido de hidrogênio. Nessa ocasião, foi determinada a área foliar (AF), por meio de um medidor de superfície tipo (LI – 3100, Area Meter, Li-Cor., Inc., Lincoln, Nebraska, USA). O restante das folhas, dos caules e das raízes foram mantidas em estufa com circulação forçada de ar, a 60 °C, por 72 h. Após a secagem, determinaram-se as massas seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR).

### **6.2.3 Análise estatística**

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com tratamentos dispostos em arranjo fatorial 2 × 7, correspondendo a duas concentrações de NaCl [0 mM e 80 mM] e 7 concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 1, 5, 10, 25, 50 e 100 mM), com cinco repetições (uma planta por vaso). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e em seguida, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a um nível de significância de 0,05%.

### 6.3 Experimento II – Aclimação a salinidade mediada pelo pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 25 mM

#### 6.3.1 Semeadura, condições de cultivo e tratamentos

Os procedimentos relacionados a semeadura e ao cultivo inicial das plantas foram realizados conforme descrito no item 6.1.2. No entanto, após o período de aclimação, deu-se início ao pré-tratamento foliar das plantas de feijão. As plântulas foram pulverizadas com água destilada ou solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração de 25 mM (selecionada em um experimento preliminar). Após 24 horas, as pulverizações foram repetidas. No dia seguinte, as plântulas foram transferidas para vasos de 3 L e submetidas ao tratamento com NaCl a 80 mM, sendo a adição realizada de forma parcial, com NaCl a 40 mM/dia. Desta forma, ao final obtivemos os tratamentos conforme tabela 2.

**Tabela 2** - Pré-tratamento realizado sobre as folhas de feijão-de-corda com água destilada ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 mM) e tratamento adicionado à solução nutritiva, (NaCl 80 mM) ou nenhum.

<b>Tipo de pré-tratamento realizado nas folhas</b>	<b>Tipo de tratamento adicionado à solução nutritiva</b>	<b>Tratamentos realizados</b>
Pulverização com água destilada	Nenhum	Água/ controle
Pulverização com água destilada	NaCl (80 mM)	Água/ salino
Pulverização com peróxido de hidrogênio (25 mM)	Nenhum	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / controle
Pulverização com peróxido de hidrogênio (25 mM)	NaCl (80 mM)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / salino

#### 6.3.2 Coleta de material vegetal para as análises fisiológicas, bioquímicas e moleculares.

As coletas das folhas de feijão-de-corda foram realizadas antes da pulverização e após a pulverização do peróxido de hidrogênio, ficando estabelecidos os tempos de coletas, como (0, 48, 96 e 240 h). Para cada planta, a primeira folha completamente expandida, a contar da base, foi congelada em N<sub>2</sub> e armazenado em freezer a -80 °C, para a análise bioquímica. A segunda foi congelada em N<sub>2</sub> e armazenado em freezer a -80 °C, para a análise proteômica.

#### 6.3.3 Preparação dos extratos para os ensaios enzimáticos e peroxidação lipídica

Inicialmente, cerca de 0,8 g das folhas foram maceradas utilizando-se gral e pistilo resfriados. Esse material foi homogeneizado com 3,5 mL de tampão de extração (tampão



fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 com EDTA 0,1 mM). Ao tampão de extração foi adicionado ácido ascórbico 2 mM, somente para a análise da APX. A solução resultante foi filtrada em tecido de náilon e centrifugada a 12 000 x g durante 15 minutos. A fração do sobrenadante foi distribuída em microtubos e armazenada em freezer a - 25 °C. Os procedimentos foram realizados a 4 °C. O extrato bruto foi utilizado para determinação da atividade enzimática através de medidas espectrométricas. Os extratos para a peroxidação de lipídeos foram obtidos a partir da maceração de 0,2 g de folhas e misturadas a 1,5 mL da solução de TCA a 5%. Eles foram misturados durante 5 minutos e mantidos resfriado a 4 °C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10.000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -25 °C. A concentração de proteína foi determinada em cada extrato, segundo o método de Bradford (1976).

#### **6.3.4 Atividade da superóxido dismutase**

A atividade da superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) foi determinada, conforme metodologia descrita por Beauchamp e Fridovich (1971). Inicialmente, em tubos de ensaio foram adicionados 1000 µl de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,8, com EDTA 0,1 mM e metionina a 19,5 mM. Em seguida, em um ambiente escuro foram incluídos ao meio de reação 50 µl de extrato diluído (1:5), 150 µl de azul de *p*-nitrobluetetrazolio (NBT) a 750 µM e 300 µl de riboflavina 10 µM. Os tubos foram transferidos para uma câmara escura que continha lâmpadas fluorescentes de 20 W (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). As lâmpadas foram ligadas durante 15 minutos, após transcorrer esse período, sendo depois desligadas para interromper a reação. Os tubos permaneceram protegidos da luz, em seguida foram realizadas as leituras em espectrofômetro a 560 nm. A atividade enzimática foi estimada através do aumento da absorvância neste comprimento de onda, devido a produção de azul de formazana, resultante da fotorredução do NBT. O cálculo da atividade enzimática da SOD foi realizado a partir das leituras espectrofotométricas, sendo expresso em UA mg<sup>-1</sup> proteína. Uma unidade de atividade da SOD corresponde à quantidade da enzima necessária para inibir 50% da redução do NBT.

#### **6.3.5 Atividade da catalase**

A atividade da catalase (CAT; E.C. 1.11.1.6) foi determinada através do método de Havir e McHale (1987). A reação foi iniciada pela adição de 1290 µL de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 com EDTA 0,1 mM, em tubos de ensaio. Os tubos foram transferidos para

banho-maria a 30 °C. Posteriormente, 60 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 M e 150 µl de extrato enzimático foram adicionados ao meio de reação. A redução na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi monitorada a 240 nm e quantificada por seu coeficiente de extinção molar (36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

### **6.3.6 Atividade do ascorbato peroxidase**

A atividade total do ascorbato peroxidase (APX; E.C. 1.11.1.1) foi determinada conforme metodologia descrita por Nakano e Asada (1981). Inicialmente, foram adicionados 1.100 µl de tampão fosfato de potássio 50 mM com EDTA 0,05 mM, pH 6,0 em tubos de ensaio. Em seguida, eles foram transferidos para banho-maria a 30 °C. Posteriormente, 300 µl de extrato enzimático, 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30 mM e 50 µl de ácido ascórbico 15 mM foram adicionados ao meio de reação. A reação foi iniciada e ocorreu o acompanhamento do decaimento da absorbância a 290 nm em espectrofotômetro, durante 300 segundos. Os cálculos da atividade enzimática total da APX foram realizados a partir das leituras espectrofotométricas e foram expressas em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína. O coeficiente de extinção molar do ascorbato 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> foi utilizado nos cálculos de atividade da APX.

### **6.3.7 Peroxidação lipídica**

A peroxidação de lipídios de membrana foi determinada pela quantificação da concentração de malondialdeído (MDA) produzido pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme descrito por Heath e Packer (1968). O volume de 0,5 ml de extrato bruto foi misturado com 0,5 ml da solução de TBA 0,5% e ácido tricloroacético (TCA) 20%. Os tubos foram deixados em banho-maria a 95 °C, durante 30 minutos. Decorrido esse tempo, os tubos foram resfriados em banho de gelo para interromper a reação. Em seguida eles foram centrifugados a 3.000 g por 10 minutos e o sobrenadante coletado. A absorbância do sobrenadante foi medida a 532 nm e 600 nm. A obtenção da leitura espectrofotométrica para os teores de TBA ocorreu após a subtração da absorbância não específica (600 nm), da específica 532 nm. O conteúdo de MDA foi determinado usando seu coeficiente de extinção molar (155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em nmol de MDA g<sup>-1</sup> de matéria fresca (MF).

### 6.3.8 *Análise estatística*

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com tratamentos dispostos em arranjo fatorial  $2 \times 2$ , correspondendo a duas concentrações de NaCl [0 mM e 80 mM] e duas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 mM e 25 mM), com cinco repetições (uma planta por vaso), totalizando 20 parcelas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e em seguida, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a um nível de significância de 0,05%.

### 6.3.9 *Padrões eletroforéticos bidimensionais*

#### 6.3.9.1 *Enzimas e outros reagentes*

Para a análise proteômica, os reagentes Coomassie Brillante Blue G-250 e  $\beta$ -mercaptoetanol (2-ME) foram obtidos da Sigma-Aldrich, Brasil. Ditioneitol (DTT), fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF), iodoacetamida, óleo mineral, tiouréia, uréia, tiras para focalização isoeletrica de 3-10 e 4-7, IPG *buffer* 3-10 e 4-7 e *Low-Range Rainbow* foram obtidos da GE-Healthcare do Brasil. A enzima tripsina foi obtida da Promega, Madison, USA. Os demais reagentes utilizados de grau analítico foram obtidos comercialmente de diferentes fornecedores.

#### 6.3.9.2 *Extração das proteínas totais*

A etapa da extração das proteínas totais foi realizada segundo o método descrito por Shen *et al.* (2002), com algumas modificações. Aproximadamente 200 gramas de folhas foram maceradas com nitrogênio líquido, utilizando gral e pistilo. O pó obtido desse material foi misturado com 200 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizado com 10 mL do tampão de extração que continha Tris-HCl a 40 mM, (pH 7,5), sacarose a 250 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10 mM, Triton X-100 a 1%, (PMSF) a 1,0 mM e (DTT) a 1,0 mM. A mistura foi agitada vigorosamente, por 1 h a 4 °C e centrifugada a 15.000 x g por 15 min a 4 °C. Para precipitação das proteínas, ao sobrenadante foram adicionados 15 mL de TCA a 10%, em acetona gelada e deixada em repouso a -20 °C, durante 24 h. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 15.000 x g por 15 min, sendo o precipitado submetido a sucessivas lavagens com acetona gelada e deixado secar. As amostras proteicas foram solubilizadas com 300  $\mu$ L do tampão, contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS a 2%, tampão de IPG 3-10 a 2% e DTT a 0,3%. As proteínas foram solubilizadas por 1 h e depois centrifugadas a 12.000 x g

por 10 minutos, a 25 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para as próximas determinações.

#### 6.3.9.3 Determinação de proteínas totais

A determinação das proteínas totais, obtidas no processo de extração, foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976). Os teores das proteínas foram determinados a partir da adição em tubos de ensaio de 100 µL da amostra, convenientemente diluída, com 1 mL do reagente Coomassie G-250. Em seguida os tubos foram agitados vigorosamente. As amostras foram lidas a 595 nm, após permanecer durante 15 minutos em contato com o corante, à temperatura ambiente. A concentração de proteínas foi estimada em relação a uma curva-padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA).

#### 6.3.9.4 Eletroforese unidimensional

Para avaliar a qualidade do material proteico do extrato total foi realizada eletroforese unidimensional, em gel de poliacrilamida (PAGE), na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970), adaptado para o uso em placas verticais. As amostras foram ressuspensas em tampão (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2,0% (m/v), glicerol 2% (v/v), β-mercaptoetanol 5,0% (v/v) e azul de bromofenol 0,1% (m/v). Em seguida, elas foram incubadas em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Após esse tratamento, 15 µL de cada amostra foi aplicada ao gel de poliacrilamida, que era composto pelo *stacking gel* 4% e *main gel* 12%. A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 100 V, utilizando a fonte *Electrophoresis Power Supply* – EPS 601. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-HCl 25 mM, pH 8,3 contendo glicina 192 mM e SDS 0,1%. Após a corrida, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1% durante 2 h. Para a visualização das bandas proteicas, o gel foi descorado pela solução de metanol 30% (v/v) e ácido acético 7% (v/v). Aproximadamente 5µL do marcador *Low-Range Rainbow* (GE-Healthcare) foi utilizado.

#### 6.3.9.5 Eletroforese Bidimensional

A partir dos resultados das determinações das proteínas, os volumes apropriados das amostras, contendo 400 µg de proteínas foram diluídos em solução de reidratação [uréia a 8 M, CHAPS a 2% (m/v), IPG *buffer* 3-10 a 2% (v/v), DTT a 0,3% e azul de bromofenol a

0,002% (m/v)] para um volume final de 0,25 mL. Em seguida, as amostras foram aplicadas em uma bandeja de reidratação (*Immobiline Drystip Reswelling Tray*, Amersham Biosciences). Em seguida, as tiras de 13 cm, com gradiente de pH imobilizado (*Immobiline Dry Strip*, pH 4-7 ou 3-10, GE-Healthcare) foram deixadas em contato com a mistura na bandeja. Nessa ocasião foram adicionados sobre as tiras, óleo mineral para impedir a evaporação e desidratação da amostra durante o processo e evitar a cristalização da uréia. O material permaneceu em temperatura ambiente por 16 horas. A focalização isoeletrica foi realizada no equipamento *Ettan IPGPhor III* (GE- Healthcare) a temperatura constante de 20 °C. A focalização foi realizada em quatro fases no módulo gradiente. A voltagem foi inicialmente ajustada para 200 V durante 60 minutos, em seguida aumentada para 500 V por 120 minutos, depois aumentada para 1000 V por 120 minutos e finalmente aumentada lentamente até atingir 8000 V durante 8:00 h.

Após a focalização isoeletrica, as tiras foram equilibradas sob agitação em 3 mL de solução de equilíbrio (Tris-HCl a 50 mM, pH 8,8, uréia a 6 M, glicerol a 30%, SDS a 2% e azul de bromofenol) com DTT a 1% (m/v) durante 15 minutos. Em seguida, a mesma solução de equilíbrio foi utilizada para alquilar as proteínas com iodoacetamida a 2,5% (m/v) durante 15 minutos. Após essa fase, as tiras foram transferidas para o topo dos géis de poli(acrilamida) na concentração de 12,5% e seladas com uma solução de agarose a 0,5% e azul de bromofenol a 0,002% (m/v). A segunda dimensão foi realizada na unidade de eletroforese vertical *SE 600 Ruby* (GE-Healthcare), sendo o sistema alimentado pela fonte *EPS 3501 XL*. Inicialmente, para cada gel foi aplicada uma corrente constante de 15 mA, durante 60 minutos e, decorrido esse tempo, a amperagem foi aumentada para 30 mA, até que o azul de bromofenol atingisse o final do gel. O processo ocorria em média durante 5 horas. A corrida foi realizada com voltagem constante a 300 V, utilizando a fonte *Power-Supply-EPS 601* (GE- Healthcare). O marcador molecular *High Raing Raibow* (GE-Healthcare) foi utilizado no volume de 5 µL.

Após a corrida, os géis foram fixados com a solução de ácido acético a 10% (v/v) e etanol a 40% (v/v). Os géis foram corados com solução de *Coomassie Coloidal G-250* a 0,1% (m/v) durante 72 horas, depois descorados e conservados em solução de ácido acético 5%. Os géis foram escaneados utilizando o programa *LabScan* v. 5.0 (GE-Healthcare) no *ImageScanner* (Amersham Biosciences) e as imagens obtidas no formato *mel*, analisadas no programa *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE-Healthcare).

#### 6.3.9.6 Análise das imagens

No programa *ImageMaster 2D*, as imagens dos géis obtidos foram padronizadas, com o intuito de minimizar distorções nas análises. Nas configurações de exibição dos géis, para o ajuste do contraste, determinou-se a escala de cinza. As imagens tinham resoluções de 300 dpi. A detecção dos *spots* foi realizada otimizando os seguintes parâmetros (contraste de 30%, área mínima de 50% e saliência de 50), seguida de correções manuais. As correções ocorriam para adição ou subtração de *spots*. Por exemplo, a adição ocorreria somente se houvessem repetições de *spot* em pelo menos dois géis da triplicata. No entanto, se o *spot* estivesse presente em apenas um gel, ele não era considerado válido.

Para a criação dos *matches*, os seguintes procedimentos foram realizados: 1. estabelecimento dos géis de referência; 2. ajuste dos pontos isoeletricos e das massas moleculares; 3. Escolha dos *landmarks* para cada tratamento e entre tratamentos e 4. criação das classes. Os géis bidimensionais foram comparados da seguinte forma: os *spots* das triplicatas dos géis do tratamento (água/controle) foram comparados entre si, assim como os *spots* das triplicatas dos géis dos outros 3 tratamentos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ controle, água/ salino e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ salino). Um total de 12 géis foram comparados entre si. Em seguida, os dados gerados foram analisados e as variações na intensidade dos *spots* proteicos foram consideradas válidas para *spots* com aumento ou diminuição nos valores de intensidade de pelo menos 1,4 vezes.

#### 6.3.9.7 Digestão triptica

Após as análises dos géis bidimensionais, as proteínas de interesse foram retiradas dos géis com o auxílio de ponteiros esterilizados e transferidas para microtubos. A digestão com tripsina foi realizada segundo o método descrito por Shevchenko *et al.* (2006). Os pedaços dos géis selecionados foram descorados com solução de bicarbonato de amônio a 25 mM, em acetonitrila a 50%, pH 8,8. Para remoção completa do corante e do SDS, foram realizadas duas lavagens com 200 µL da solução descorante e em seguida realizadas agitações vigorosas. Posteriormente, os tubos foram deixados em mesa agitadora, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Na segunda lavagem, os pedaços de géis permaneceram em contato com a solução descorante por 24 h. No dia seguinte, mais uma lavagem com a solução descorante foi realizada. A remoção da solução descorante foi feita e os pedaços dos géis foram desidratados duas vezes, com 200 µL de acetonitrila 100%, durante 5 min. A remoção da acetonitrila e a secagem dos géis foram realizadas por 30 minutos em centrifuga a vácuo. Em seguida, os pedaços de géis

foram reduzidos com 100  $\mu\text{L}$  do DTT 65 mM em bicarbonato de amônio 100 mM durante 30 minutos. Após a remoção desta solução em ambiente escuro, os géis foram alquilados com 100  $\mu\text{L}$  de iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, durante 30 minutos. Os géis foram lavados com 200  $\mu\text{L}$  de bicarbonato de amônio 100 mM durante 5 minutos e desidratados com acetonitrila 100% durante 5 minutos. Esse procedimento foi repetido mais uma vez. Os géis foram secos em centrifuga a vácuo e em seguida foram reidratados, por 45 minutos a 4 °C, com 15  $\mu\text{L}$  de tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin*, Promega) na concentração de 20 ng/ $\mu\text{L}$  e adicionados bicarbonato de amônio a 40 mM em acetonitrila a 10%. As digestões das amostras ocorreram durante 18 horas a 37°C. Posteriormente, os peptídeos foram extraídos dos géis através de sucessivas lavagens com 30  $\mu\text{L}$  da solução de ácido fórmico a 5% em acetonitrila 50%, com auxílio de um sonicador (UltraCleaner 1400A, Unique). As amostras foram transferidas para novos microtubos e secas em centrífuga a vácuo (SpeedVac SVC100H, Savant, USA). As amostras permaneceram armazenadas em freezer a -20 °C. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas, em solução aquosa de 0,2% de ácido fórmico para a análise por espectrometria de massa.

#### 6.3.9.8 Espectrometria de massas por ESI-Q-TOF e identificação das proteínas

Os peptídeos gerados por digestão com tripsina foram injetados em um sistema *nanoAcquity* (Waters Corp), conectado a uma fonte de nano *electrospray* de um espectrômetro de massas híbrido (SYNAPT HDMS – Waters Corp). O espectrômetro foi calibrado na faixa de  $m/z$  50 a 1600, com os fragmentos do íon de [Glu1]-fibrinopeptídeo B. O analito foi aplicado em uma coluna de fase reversa C18 (75  $\mu\text{m}$  x 100 mm) e os peptídeos foram eluídos através do gradiente linear de 10% a 85% de acetonitrila, contendo ácido fórmico 0,1%. O espectrômetro de massas operou em modo positivo na faixa de  $m/z$  50 a 3000, sob voltagem do capilar de 3,0 kV e temperatura da fonte de 90 °C. As análises de LC-MS/MS foram conduzidas de acordo com a função DDA (*Data Dependent Analysis* – Análise Dependente de Dados), sendo selecionados para análise de MS/MS íons precursores com carga ( $z$ ) entre 2<sup>+</sup> e 4<sup>+</sup>. O *lock mass* utilizado durante a coleta de dados foi o íon de  $m/z$  785,84 de [Glu1]-fibrinopeptídeo B. Os íons selecionados foram fragmentados por CID (*Collision Induced Dissociation*), utilizando argônio como gás de fragmentação. Os espectros foram coletados e processados pelo programa *ProteinLynx* versão 2.4 (Waters Corp, MA, USA) e convertidos em arquivos de texto, contendo as massas e intensidades dos peptídeos detectados (*peak list*) para pesquisa posterior em banco de dados.

Os dados obtidos foram submetidos ao programa de busca MASCOT (Matrix Science, London, UK). Os bancos de dados utilizados foram o *SwissProt* e o NCBI (National Center for Biotechnology Information) não-redundante, com buscas restritas para *Viridiplantae* (Green Plants). Para busca e comparação no banco de dados, foram utilizados os parâmetros de modificações dos peptídeos: um sítio perdido de clivagem da tripsina, cisteínas modificadas por carbamidometilação e oxidação parcial da metionina. A comparação entre as massas moleculares (MM) teóricas e experimentais e os valores de pI (ponto isoelétrico) também foram consideradas para as identificações. As proteínas também foram identificadas através de *EST* para *Vigna radiata* e *angulares*.



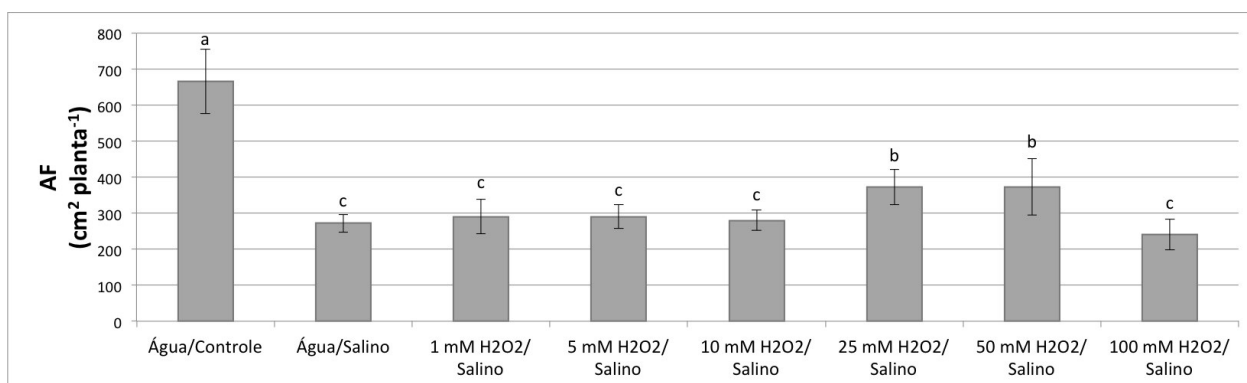
## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 Experimento I – Avaliação da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que minimizasse os efeitos da salinidade em plantas de feijão-de-corda (cultivar TVu)

#### 7.1.1 Crescimento

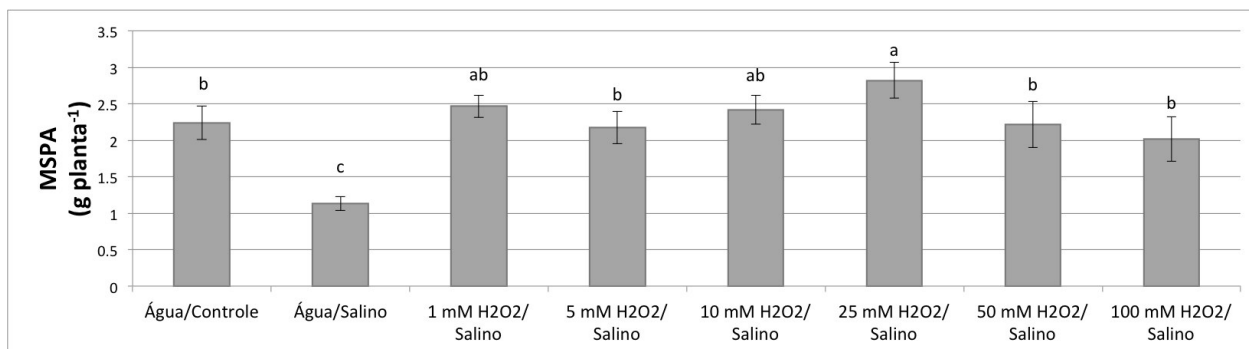
Plantas de feijão-de-corda cultivar TVu pré tratadas com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1, 5, 10, 25, 50 e 100 mM) e submetidas ao estresse salino (NaCl 80 mM) foram avaliadas após 240 h da pulverização foliar (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), quanto aos parâmetros de crescimento, tais como: área foliar (AF), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR).

Para a área foliar (AF), observou-se que entre as plantas que receberam o tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino, aquelas que foram pulverizadas com a solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 25 e 50 mM tiveram um aumento significativo, tanto em relação àquelas do tratamento água/salino, bem como em relação a outras concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 3).

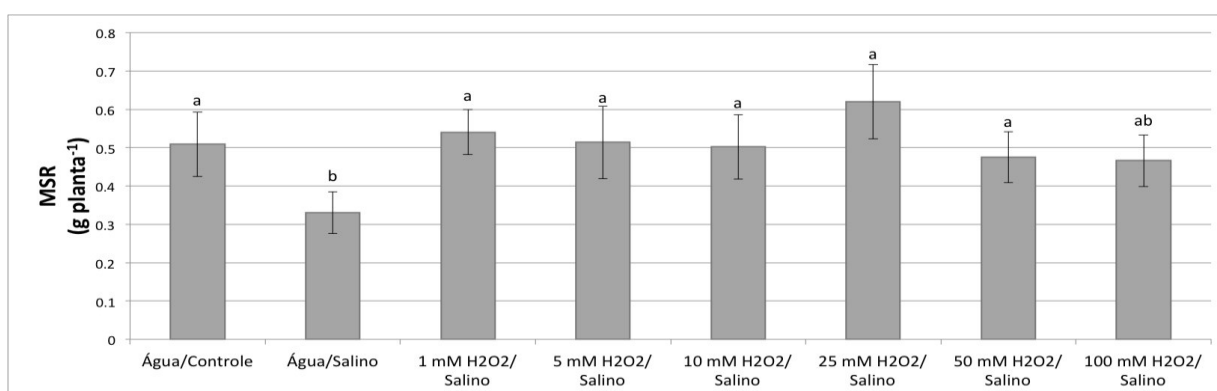


**Figura 3** - Área foliar (AF) de plantas de feijão-de-corda sob condições controle ou salina (NaCl 80 mM), pulverizadas com água destilada ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100 mM). Os dados referem-se a coleta realizada após 240 h do início da pulverização com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Valores com letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes entre si de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05).

Em relação às análises de MSPA e MSR, observaram-se que valores menores em plantas submetidas ao tratamento água/salino em relação ao tratamento água/controle (Figuras 4 e 5). Esses resultados revelam o efeito inibitório do NaCl (80 mM) na produção de biomassa nas folhas do feijão-de-corda. Esta redução na MSPA, afeta a produção de biomassa pela planta e diminui a área foliar disponível para a fotossíntese (PARIDA; DAS; MITTRA, 2004). Isso também tem efeitos diretos sobre a MSR (Figura 5), haja vista que a salinidade, além de reduzir a produção de biomassa, também pode alterar a partição dos fotoassimilados entre as diferentes partes das plantas (SILVA *et al.*, 2003).



**Figura 4** - Matéria seca da parte aérea (MSPA) de plantas de feijão-de-corda sob condições controle ou salina (NaCl 80 mM), pulverizadas com água destilada ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100 mM). Os dados referem-se a coleta realizada após 240 h do início da pulverização com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Valores com letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes entre si de acordo com o teste de Tukey (P<0,05).



**Figura 5** - Matéria seca das raízes (MSR) de plantas de feijão-de-corda sob condições controle ou salina (NaCl 80 mM), pulverizadas com água destilada ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em diferentes concentrações (1, 5, 10, 25, 50 e 100 mM). Os dados referem-se a coleta realizada após 240 h do início da pulverização com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Valores com letras minúsculas distintas são estatisticamente diferentes entre si de acordo com o teste de Tukey (P<0,05).

As plantas que receberam o tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino, sendo pulverizadas com a solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 25 mM tiveram um aumento significativo em MSPA, quando comparadas àquelas do tratamento água/salino (Figura 4). Já para a MSR, a maioria dos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino revelou aumento de massa em relação ao tratamento água/salino.

A salinidade representa um sério problema, limitando a produtividade das culturas (SHABALA *et al.*, 2014). No estresse salino, os principais processos metabólicos são afetados e conseqüentemente há uma redução da taxa de expansão da superfície foliar (MAHAJAN; TUTEJA, 2005). A diminuição da área foliar (Figura 3), da massa seca da parte aérea e da raiz (Figuras 4 e 5) corroborou com os dados obtidos por Costa *et al.* (2003) e Praxedes *et al.* (2010), esses autores observaram que o estresse salino limitou o crescimento do cultivar TVu, principalmente o da parte aérea. Nesse contexto, Munns e Termaat (1986) relatam que a redução no crescimento foliar é inicialmente regulada por sinais hormonais, especialmente envolvendo o ácido abscísico (ABA), o qual é produzido nas raízes e transportado via xilema

até as folhas, como resposta à diminuição do potencial hídrico do solo. Posteriormente, a redução no crescimento foliar seria devido ao acúmulo excessivo de íons tóxicos no citosol das células foliares, haja vista que o NaCl pode interferir com a absorção do  $\text{Ca}^{2+}$  e níveis baixos desse elemento prejudica a estabilidade da membrana, a manutenção do balanço osmótico e a sinalização intracelular (RENGEL, 1992), o que interfere com o crescimento. Além disso, o acúmulo de sais no apoplasto pode causar a desidratação das células e inibir a expansão dos tecidos foliares (MÜHLING; LAUCHLI, 2002).

Sabe-se que as EROS podem servir na sinalização, regulando as respostas ao estresse, bem como o crescimento e desenvolvimento (FOYER; NOCTOR, 2005). Dentre as EROS, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem melhorado o crescimento e o desempenho fisiológico em algumas culturas (ISHIBASHI *et al.*, 2011; KAO, 2014), de forma dependente da concentração (RAZEM, 2008). Nesse cenário, Hasan *et al.* (2016) observaram que o tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumentou os parâmetros de crescimento do feijão tais como: área foliar, massa fresca e seca da parte aérea e da raiz. Respostas semelhantes foram encontradas neste trabalho, especialmente para as plantas que receberam o tratamento  $\text{H}_2\text{O}_2$ /salino, sendo pulverizadas com a solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 25 mM. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  também desempenha papel importante no desenvolvimento do sistema radicular (LIAO *et al.*, 2009; MA *et al.*, 2014; HERNÁNDEZ-BARRERA *et al.*, 2015), o que concorda com a maioria dos resultados encontrados aqui.

Essas respostas podem estar relacionadas ao fato de que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode interagir com diferentes moléculas de sinalização, tais como: hormônios (SHI *et al.*, 2015), proteínas quinases (GONZALEZ *et al.*, 2012) e muitas outras pequenas moléculas de sinalização (LI *et al.*, 2015). Assim, essas moléculas podem regular conjuntamente a divisão celular e diferenciação, bem como a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento da planta. Há estudos que relacionam o  $\text{H}_2\text{O}_2$  com a proliferação de células (FOREMAN *et al.*, 2003; GEISZT; LETO, 2004) e a diferenciação (KONIECZNY *et al.*, 2014; POTIKHA *et al.*, 1999). Há outros trabalhos que relacionam a interação entre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e hormônios. Como relatam Orabi, Dawood e Salman (2015), que ao realizar o tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$  em cultivares de tomate, verificaram um aumento significativo nos parâmetros de crescimento, sugerindo que isso ocorreu devido ao aumento acentuado dos reguladores de crescimento endógenos, como ácido giberélico (GA3), ácido indol-3-acético (IAA) e ácido abscísico (ABA). Ademais, há autores que relacionam a interação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com o  $\text{Ca}^{2+}$  nas células da raiz, como relatam Demidchik *et al.* (2007) e Han *et al.* (2015) em *Arabidopsis*. Isso pode acontecer, pois o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ativar os receptores de  $\text{Ca}^{2+}$  e proteínas alvo para aumentar o  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático durante o crescimento

e desenvolvimento da planta. A inter-relação entre o  $H_2O_2$  e  $Ca^{2+}$  pode estar envolvida no crescimento, desenvolvimento e nas respostas ao estresse abiótico. Nesse contexto, Li *et al.* (2011) observaram que durante o estresse salino houve a acumulação de  $H_2O_2$  em via dependente de  $Ca^{2+}$ , a qual foi correlacionada com vias de tolerância ao sal em raízes de *Arabidopsis*.

Além dessas interações do  $H_2O_2$  com outras moléculas, o efeito biológico do  $H_2O_2$  sobre as plantas está relacionado a outros fatores, tais como: o local em que é produzido e sua concentração (PETROV; BREUSEGEM, 2012). Sabe-se que o apoplasto é um importante local para a produção de  $H_2O_2$  em resposta às condições ambientais adversas, como a salinidade (HERNÁNDEZ *et al* 2001; HU *et al* 2005; HU *et al.*, 2006; JUBANY-MARI *et al.* 2009). As respostas de aclimação das plantas ao estresse salino podem envolver a acumulação do  $H_2O_2$  durante o crescimento e no fortalecimento da parede celular (HERNÁNDEZ *et al* 2001; RODRIGUEZ *et al* 2004; ROS BARCELÓ, 2005; JUBANY-MARI *et al.* 2009). Há autores, como Rodriguez *et al.* (2004), que relatam que a geração de EROS apoplástica tem um efeito positivo sobre o alongamento foliar em plantas de milho durante o estresse salino. Desta forma, a aplicação exógena de  $H_2O_2$  25 mM, usada no presente trabalho, revelou ser a concentração que teve o maior efeito positivo sobre os parâmetros de crescimento, possivelmente permitindo o acúmulo de  $H_2O_2$  no apoplasto e portanto, promovendo a interação com vias de sinalização que regulam o crescimento em plantas de feijão-de-corda.

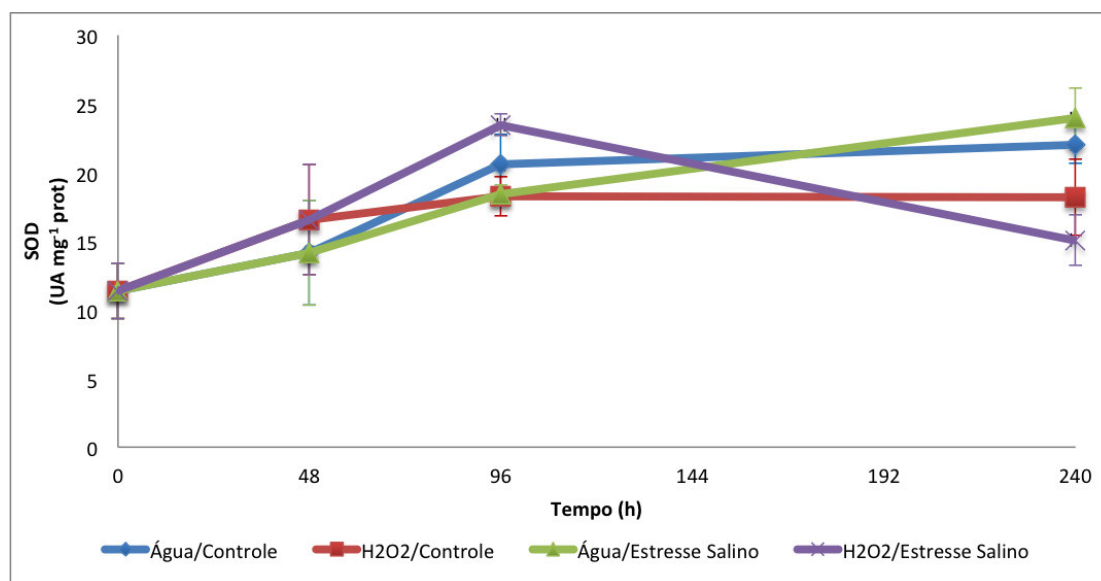
## **7.2 Experimento II - Avaliação do envolvimento do sistema antioxidante enzimático e mudanças no proteoma na aclimação à salinidade mediada pelo pré-tratamento com $H_2O_2$ a 25 mM**

A atividade de enzimas antioxidantes [superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) ] foi avaliada em plantas de feijão tempos 0, 48, 96 e 240 horas após a pulverização com  $H_2O_2$ . A análise proteômica comparativa no tecido foliar ocorreu com 240 horas após a pulverização com  $H_2O_2$ .

### **7.2.1 Dismutase do Superóxido (SOD)**

Neste estudo, verificou-se que a atividade da SOD foi significativamente aumentada nas plantas do tratamento  $H_2O_2$ /controle, alcançando valores 29,9% maiores em relação as plantas do tratamento água/controle (Figura 6; Tabela 3) no tempo de 48 horas. Entretanto, a atividade de SOD nos tempos 96 e 240h para o mesmo tratamento manteve-se

constante. Já as plantas tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino tiveram um aumento na atividade da SOD em relação ao tratamento água/salino em 96 h sendo seguido de uma redução em 240 h (Figura 6). Os valores médios para a atividade da superóxido dismutase (SOD) em folhas de plantas de feijão-de-corda, após 48, 96 e 240 horas do início da pulverização com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem ser observados na Tabela 3.



**Figura 6** - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em folhas de feijão-de-corda, cultivar TVu, sob os seguintes tratamentos: água/controle, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle, água/ salino e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino. Os dados referem-se às coletas realizadas nos tempos: 0, 48, 96 e 240 h após a pulverização das folhas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 25 mM.

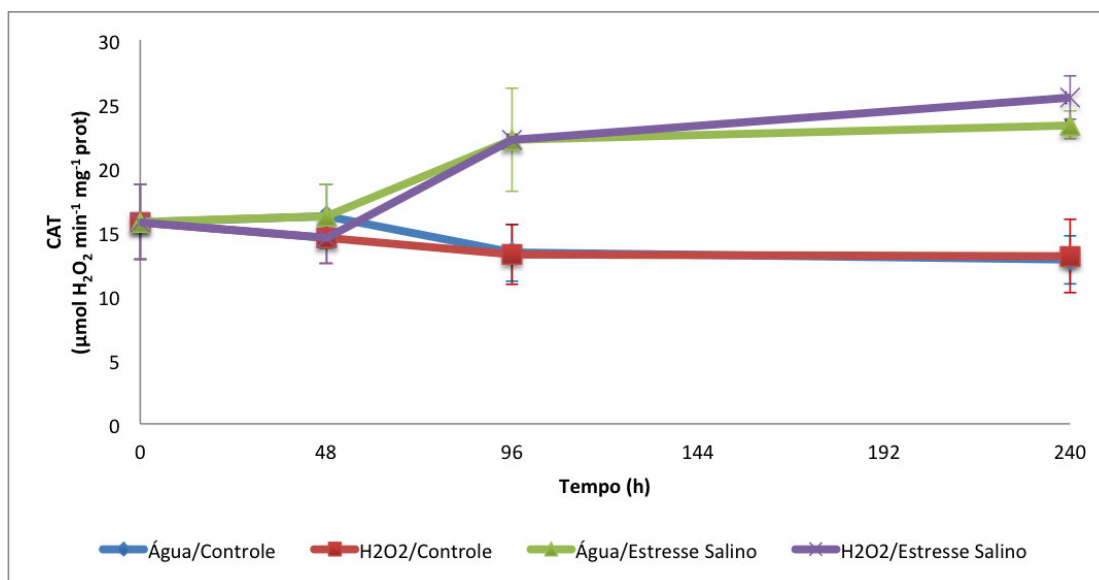
**Tabela 3** - Comparações entre os valores médios de atividade da superóxido dismutase (SOD) em folhas de plantas de feijão-de-corda, após 48, 96 e 240 h do início da pulverização com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de pré-tratamento, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ).

	48 h	96 h		240 h	
Água/Controle	b	Água/Controle	aA	Água/Controle	aA
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Controle	bB	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Controle	bA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Controle	a	Água/Estresse	bA	Água/Estresse	aA
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Estresse	aA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Estresse	bA

### 7.2.2 Catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX)

As plantas que receberam os tratamentos água/salino e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino tiveram um aumento na atividade da CAT em relação aos seus controles (água/controle e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle, respectivamente) a partir do tempo 96 h (96 e 240 h) (Figura 7). No presente estudo, não foi encontrada diferença entre os tratamentos para a atividade da APX, durante todos os tempos

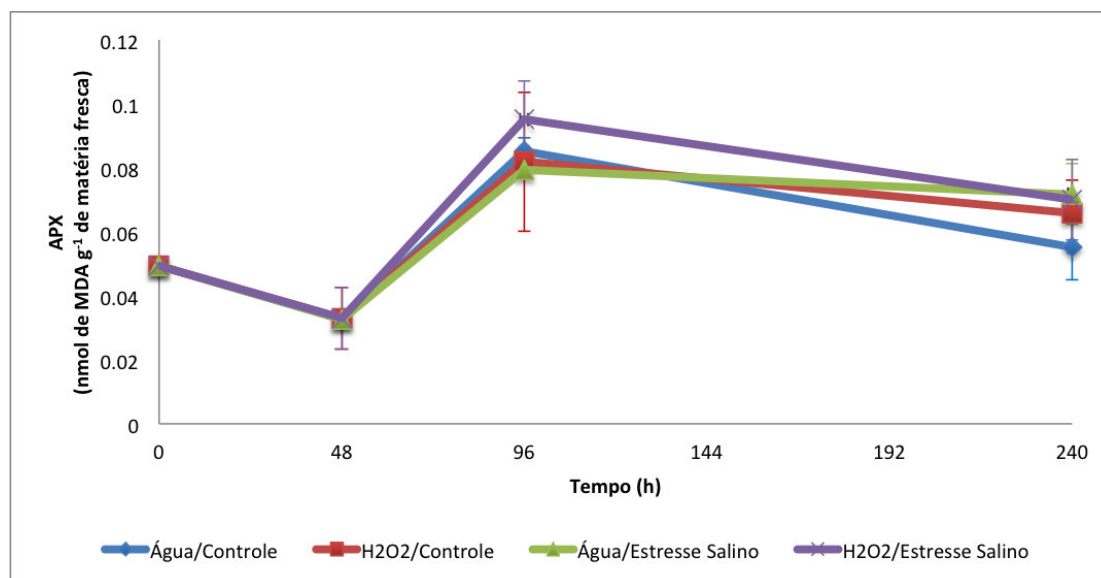
estudados (Figura 8). Os valores médios para a atividade da catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) em folhas de plantas de feijão-de-corda, após 48, 96 e 240 horas do início da pulverização com  $H_2O_2$  podem ser observados na Tabela 4 e 5.



**Figura 7** - Atividade da enzima catalase (CAT) de plantas de feijão, cultivar TVu, sob os seguintes tratamentos: água/controle,  $H_2O_2$ /controle, água/ salino e  $H_2O_2$ /salino. Os dados referem-se as coletas realizadas nos tempos: 0, 48, 96 e 240 h após a pulverização das folhas com  $H_2O_2$  a 25 mM.

**Tabela 4** - Comparações entre os valores médios de atividade da catalase (CAT) em folhas de plantas de feijão-de-corda, após 48, 96 e 240 h do início da pulverização com  $H_2O_2$ . Letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de pré-tratamento, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ).

48 h		96 h		240 h	
Água/Controle	a	Água/Controle	aB	Água/Controle	aB
		$H_2O_2$ /Controle	aB	$H_2O_2$ /Controle	aB
$H_2O_2$ /Controle	a	Água/Estresse	aA	Água/Estresse	aA
		$H_2O_2$ /Estresse	aA	$H_2O_2$ /Estresse	aA



**Figura 8** - Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) de plantas de feijão, cultivar TVu, sob os seguintes tratamentos: água/controle, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle, água/ salino e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino. Os dados referem-se as coletas realizadas nos tempos: 0, 48, 96 e 240 h após a pulverização das folhas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 25 mM.

**Tabela 5** - Comparações entre os valores médios de atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em folhas de plantas de feijão-de-corda, após 48, 96 e 240 h do início da pulverização com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de pré-tratamento, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ).

	48 h	96 h	240 h
Água/Controle	a	Água/Controle aA	Água/Controle aA
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Controle aA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Controle aA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Controle	a	Água/Estresse aA	Água/Estresse aA
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Estresse aA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Estresse aA

Sabe-se que a homeostase redox quando interrompida por um estresse, pode provocar um acúmulo de EROS. O desbalanço dessa homeostase é particularmente conhecido, como estresse oxidativo (MULLINEAUX; BAKER, 2010; SHARMA *et al.*, 2012). É necessário entender que, o estresse oxidativo pode levar a diversos danos na célula. Entretanto estudos demonstraram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é uma molécula chave na sinalização, no qual está associado com respostas que aliviam o estresse salino (SATHIYARAJ *et al.*, 2014; MOHAMED *et al.*, 2015). Nesse cenário, a exposição de plantas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode resultar na alteração da atividade metabólica e nas enzimas antioxidantes, em favor de um melhor desempenho fisiológico (BARBA-ESPÍN *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2013).

Como visto anteriormente, a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) foram analisadas, a fim de estabelecer uma possível relação entre a aplicação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a indução do sistema enzimático antioxidante. É conhecido

largamente que a salinidade é capaz de gerar EROS que são produzidas em diferentes compartimentos na célula. Como defesa, há uma produção de diversas enzimas para combater o excesso de EROS. Nesse contexto, a SOD é capaz de eliminar o  $\bullet\text{O}_2^-$ , formando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e subsequentemente, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser removido pela CAT e APX.

Neste trabalho, observam-se que o tratamento realizado com  $\text{H}_2\text{O}_2$ /controle especialmente em 48 h aumentou a atividade da SOD. É sugerido que essa resposta deve-se ao fato de que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode induzir a síntese ou ativar fatores de transcrição relacionados a indução de enzimas antioxidantes (AGARWAL *et al.*, 2005). Em 96 h, houve uma diferença entre pré-tratamentos realizados nas plantas do grupo salino, visto que a pulverização com 25 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  promoveu uma maior atividade enzimática. Como é conhecido, o estresse salino aumenta os níveis de EROS, portanto, o aumento da atividade da enzima nesse tratamento refletiria na reconhecida atuação da SOD como primeira linha de defesa na célula (FOYER; NOCTOR, 2000; XIONG; ZHU, 2001). Também é importante salientar que a SOD é encontrada em todos os compartimentos capazes de produzir EROS, particularmente em cloroplastos, mitocôndria e peroxissomos (MORAN *et al.*, 2003; CAVALCANTI *et al.*, 2004).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado em excesso é tóxico e precisa ser removido da célula em reações subsequentes. Nas plantas, CAT e APX são as principais enzimas reguladoras dos níveis intracelulares de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (GILL; TUTEJA, 2010). Neste estudo, em 96 e 240 h, verificou-se que a atividade da enzima aumentou em plantas que receberam o tratamento salino, independente da aplicação do pré-tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 25 mM. É sabido que durante o estresse salino, há diminuição de  $\text{CO}_2$  em relação ao  $\text{O}_2$  no peroxissomo promovendo o aumento da fotorrespiração e produção de glicolato no cloroplasto, o que gera  $\text{H}_2\text{O}_2$  (NOCTOR *et al.* 2002; KARPINSKI *et al.* 2003). Portanto, pode-se sugerir que o aumento da CAT ocorreu, pois ela é a principal enzima antioxidante que desintoxica  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sob o aumento das condições da fotorrespiração.

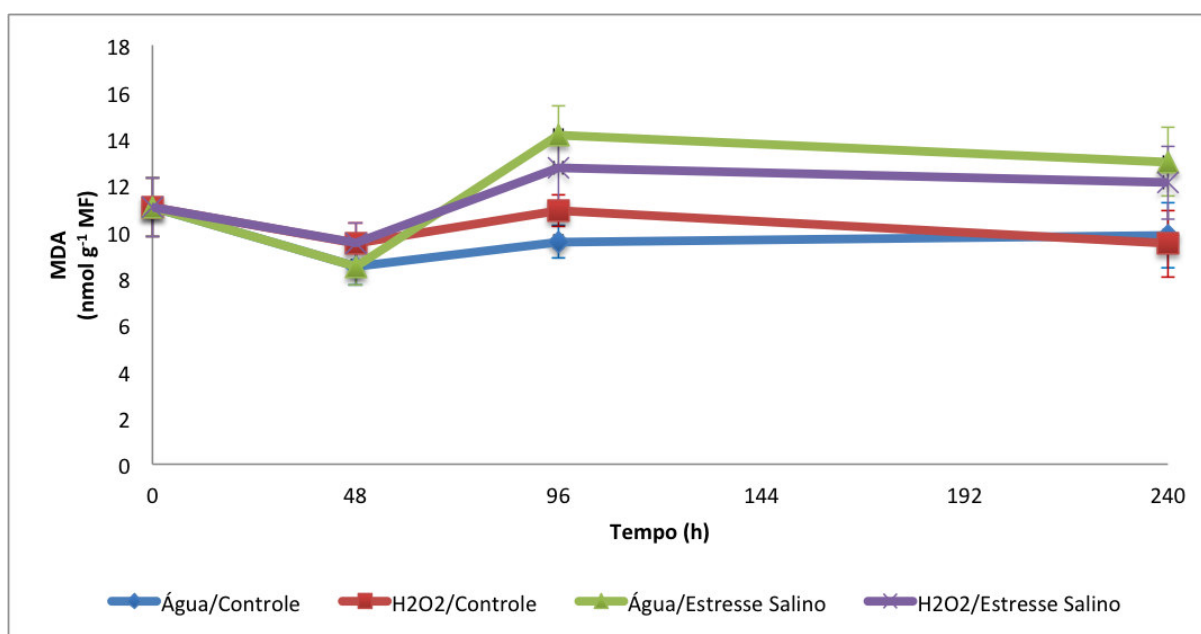
Em um estudo conduzido por Gondim *et al.* (2012), em plantas de milho submetidas ao pré-tratamento foliar com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e submetidas ao estresse salino, a atividade da CAT foi crucial na prevenção dos efeitos deletérios da salinidade. De forma semelhante, Azevedo Neto *et al.* (2006) relatam que a atividade da CAT é também crucial na prevenção dos efeitos deletérios da salinidade em plantas de milho. Neste trabalho, apesar do aumento da atividade em plantas submetidas ao tratamento salino, a prévia pulverização com  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 25 mM não tornou a atividade da enzima superior ao tratamento água/salino (Figura 7).



CAT e APX metabolizam o mesmo substrato, o  $H_2O_2$ , mas podem atuar em compartimentos diferentes. Como no presente estudo não foi encontrada diferença entre os tratamentos realizados para a APX, então, é provável que CAT tenha sido a enzima responsável pela eliminação do  $H_2O_2$ , nos peroxissomos e glioxissomos. A intensidade e duração de sinalização EROS também depende do balanço que ocorre devido a produção de EROS por oxidantes e sua remoção por antioxidantes (SHARMA *et al.* 2012). Esse balanço/equilíbrio é essencial para a manutenção da homeostase celular. Portanto, também torna-se importante avaliar danos celulares que poderiam ocorrer em virtude de um desequilíbrio na produção / acúmulo de EROS.

### 7.2.3 Danos de membrana (formação de MDA)

Com relação ao conteúdo de MDA em 48 h, verificou-se diferença significativa entre as plantas tratadas com  $H_2O_2$ /controle em relação as plantas tratadas com água/controle. Já em 96 e 240 horas, o conteúdo foi maior nas plantas submetidas aos tratamentos água/salino e  $H_2O_2$ / salino, em relação àquelas que receberam o tratamento água/controle e  $H_2O_2$ /controle (Figura 9). Os valores médios para o conteúdo de MDA em folhas de plantas de feijão-de-corda, após 48, 96 e 240 horas do início da pulverização com  $H_2O_2$  podem ser observados na Tabela 6.



**Figura 9** - Conteúdo de MDA de plantas de feijão-de-corda, cultivar TVu, sob os seguintes tratamentos: água/controle,  $H_2O_2$ /controle, água/ salino e  $H_2O_2$ /salino. Os dados referem-se as coletas realizadas nos tempos: 0, 48, 96 e 240 h após a pulverização das folhas com  $H_2O_2$  a 25 mM.

**Tabela 6** - Comparações entre os valores médios do conteúdo de malondialdeído (MDA) em folhas de plantas de feijão-de-corda, após 48, 96 e 240 h do início da pulverização com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Letras maiúsculas iguais, em um mesmo nível de pré-tratamento, ou letras minúsculas iguais, em um mesmo nível de salinidade, não diferem significativamente entre si ( $p \geq 0,05$ ).

48 h		96 h		240 h	
Água/Controle	b	Água/Controle	aB	Água/Controle	aB
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Controle	aB	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Controle	aB
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Controle	a	Água/Estresse	aA	Água/Estresse	aA
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Estresse	aA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Estresse	aA

O acúmulo das EROS pode levar ao estresse oxidativo, que provoca danos nas membranas celulares, degradação de proteínas e quebra da dupla fita do DNA (APEL; HIRT, 2004; ELKAHOUI *et al.*, 2004; MØLLER *et al.*, 2007; NGUYEN *et al.*, 2009). Um marcador de dano oxidativo, utilizado para averiguar o grau de injúria provocado à membrana celular é o MDA (malondialdeído), um produto da peroxidação lipídica. Sabe-se que o estresse oxidativo pode ser induzido pela salinidade, causando intensa peroxidação lipídica (HERNANDEZ; ALMANSA, 2002). Entretanto, a intensidade do dano oxidativo pode variar, dependendo da rapidez da proteção oxidativa (MUNNS; TESTER, 2008). Como foi observado anteriormente, nem todas as enzimas antioxidantes analisadas promoveram o aumento na sua atividade, especialmente a APX. Esse fato pode ter contribuído para haver o acúmulo das EROS, que ao invés de provocar sinalização e proteção oxidativa, promoveu o dano na membrana celular, através da peroxidação lipídica. Dessa forma, o pré tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 25 mM não foi capaz de reduzir o processo de peroxidação gerado pelo estresse salino (tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino). Entretanto, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno (tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle) até aumentou os danos de membrana em relação ao tratamento água/controle, no tempo 48h (próximo à aplicação) embora tenha voltado aos valores do controle nos tempos 96 e 240 h.

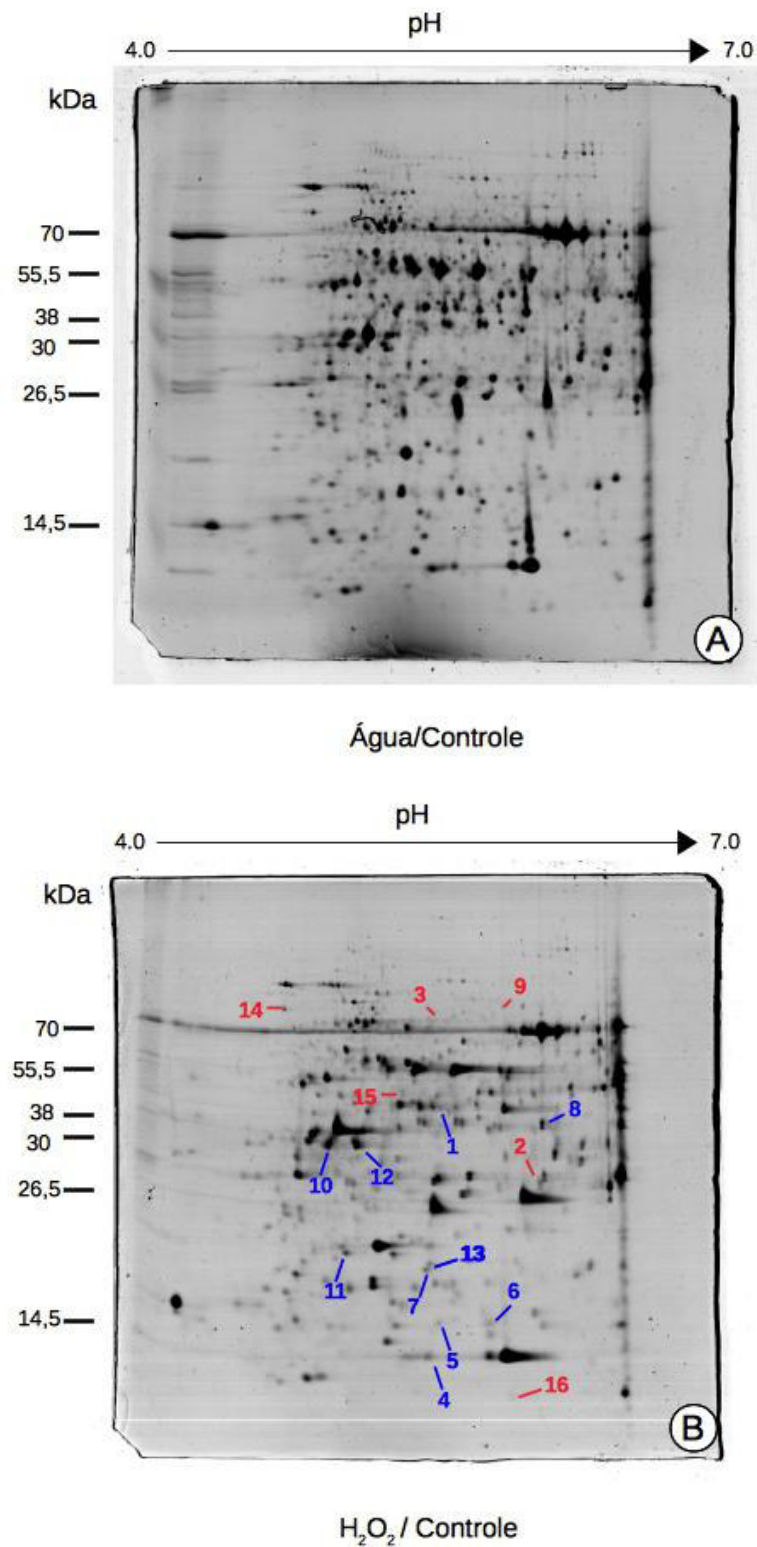
Tendo em vista a dificuldade de creditar o melhor desempenho das plantas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino em relação às plantas água/salino a ativação do sistema antioxidante enzimático, procedeu-se a uma análise através da proteômica comparativa a fim de detectar mais precisamente os eventos globais envolvidos nesse processo de aclimação.

## 7.2.4 Análise proteômica

### 7.2.4.1 Padrões proteicos bidimensionais

As proteínas totais foram extraídas de folhas de feijão-de-corda, cultivar TVu e separadas na primeira dimensão, através do seu ponto isoelétrico (pI) nos intervalos de pH 3-10. Esse intervalo foi utilizado com o intuito de verificar a faixa de pH mais adequada. A maioria das proteínas estava situada no intervalo 4-7, com massa molecular de 10,5 a 75 kDa. Esse intervalo conferiu maior resolução dos *spots*, o que facilitou a comparação posterior das proteínas nos géis. A partir dessas observações iniciais, os mapas 2-D para todos os tratamentos (água/controle, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle, água/salino e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino) foram obtidos usando tiras de 13 cm, com IPG de pH 4-7, seguido de géis de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Para detectar a diferença na abundância das proteínas das folhas, os mapas 2-DE foram comparados com o software *ImageMaster™ 2D Platinum*. Para tanto, três géis obtidos de cinco réplicas biológicas de cada tratamento foram utilizados para as análises quantitativas das imagens. Após as análises entre os tratamentos, um total de 82 *spots* proteicos expressos diferencialmente [por no mínimo  $\pm 1,4$  vezes ( $p < 0,05$ )] foram detectados.

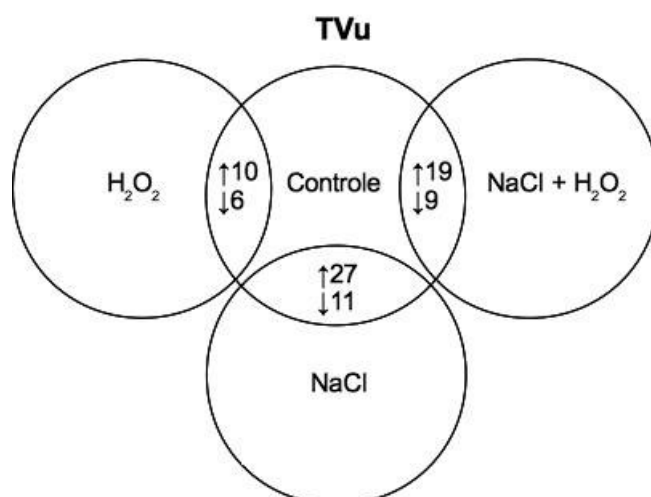
Neste trabalho, as análises dos géis entre os tratamentos água/controle e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle mostraram que 16 proteínas foram diferencialmente expressas. Dessas, 10 proteínas (1, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 e 13) tiveram um aumento na expressão em resposta ao tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle, enquanto 6 proteínas (2, 3, 9, 14, 15 e 16) tiveram uma redução na expressão, como indicam as setas na Figura 10-B.



**Figura 10** – Géis do tratamento água/controle (A) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle (B) mostrando os *spots* proteicos reguladas diferencialmente em folhas de feijão-de-corda, cultivar TVu, sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25mM), em 240 h. Nos géis, as setas em vermelho indicam menor abundância dos *spots* proteicos e as setas em azul maior. Os mapas foram obtidos usando tiras de gel de 13 cm com gradiente de pH 4-7 na focalização isoeletrica e géis de poliacrilamida a 12,5% na SDS-PAGE. Cada gel foi carregado com 400 µg de proteínas. Os *spots* proteicos foram visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

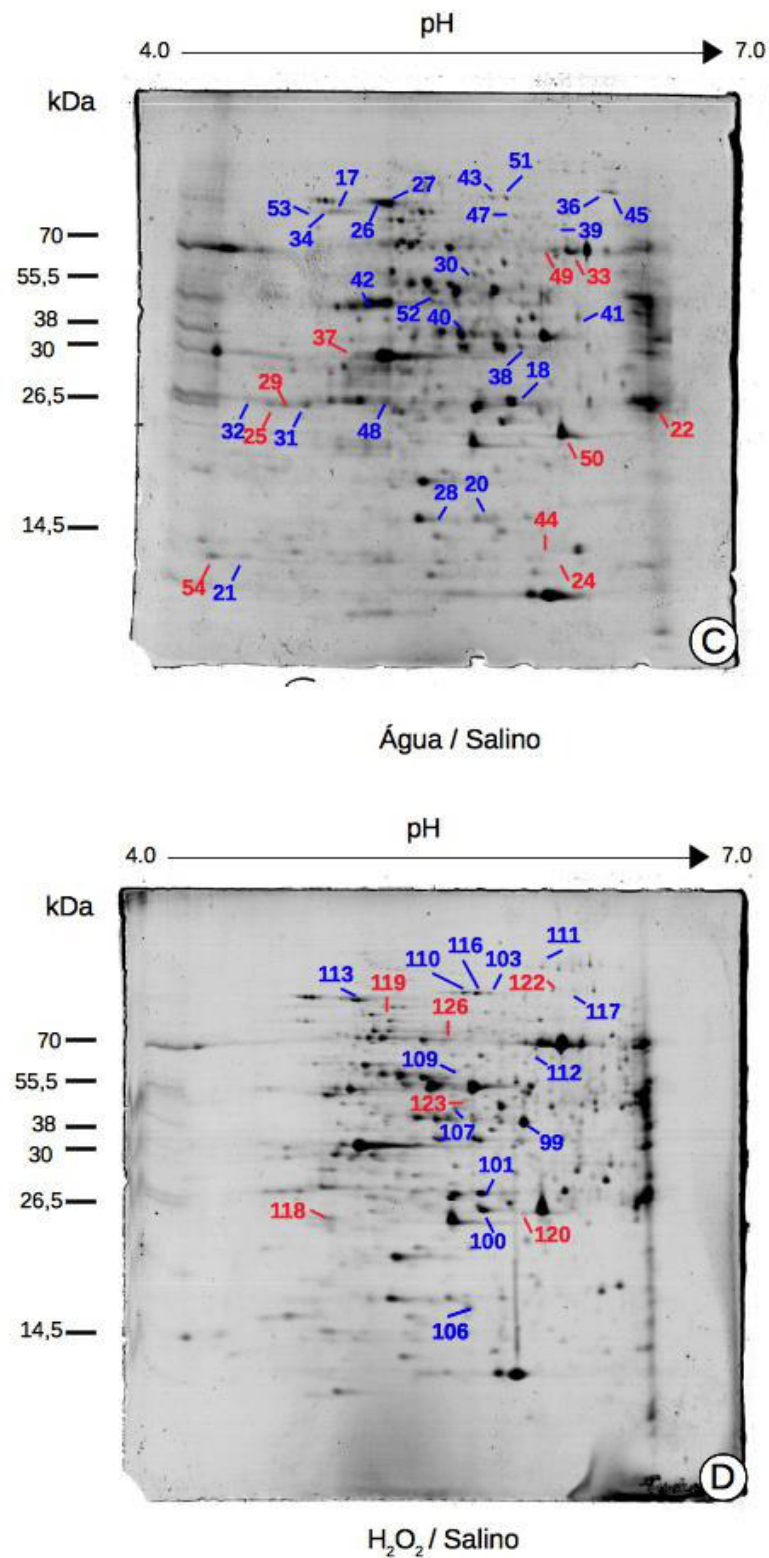
As análises dos géis entre os tratamentos água/controle e água/salino mostraram que 38 proteínas foram diferencialmente expressas (Figura 11). Nesta comparação, 27 proteínas (17, 18, 19, 20, 21, 23, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 34, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 51, 52 e 53) exibiram aumento na expressão em resposta ao tratamento salino e 11 proteínas (22, 24, 25, 29, 33, 35, 37, 44, 49, 50 e 54) exibiram uma diminuição na expressão, como pode ser observado pelas setas, na Figura 12-C.

As análises dos géis, entre os tratamentos água/controle e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ NaCl mostraram que 28 proteínas foram diferencialmente expressas (Figura 11). A combinação de tratamentos causou aumento na expressão de 19 proteínas (99, 100, 101, 103, 106, 107, 109, 110, 111, 112, 113, 116, 117, 118, 119, 120, 122, 123 e 126) e diminuição em 9 proteínas (102, 104, 105, 108, 114, 115, 121, 124 e 125) (Figura 12-D).



**Figura 11** - Diagrama de Venn representando diferentes subconjuntos de proteínas em folhas de feijão-de-corda, cultivar TVu, mostrando mudanças em sua abundância, sob o tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle, água/salino e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino em relação ao tratamento controle.

Alguns estudos proteômicos têm revelado a capacidade de ajuste das plantas frente a uma adversidade ambiental, através das mudanças provocadas em suas proteínas. E a aplicação de um agente químico pode ajudar a planta se aclimatar a essa mudança ambiental. Como foi observado por Tanou *et al.* (2009), a aplicação do peróxido de hidrogênio em folhas de *citrus* foi capaz de aliviar os efeitos do estresse salino. Abreu *et al.* (2014), encontraram 27 proteínas diferencialmente expressas quando as plantas de feijão, cultivar TVu, foram submetidas ao tratamento salino (NaCl 75 mM). No presente trabalho encontramos uma quantidade maior (38 proteínas diferencialmente expressas), durante o tratamento salino (NaCl 80 mM), entretanto deve-se salientar as diferenças na aplicação do estresse salino e tempo de análise comparando-se os dois estudos.



**Figura 12** – Géis do tratamento água/salino (C) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino (D) mostrando os *spots* proteicos reguladas diferencialmente em folhas de feijão-de-corda, cultivar TVu, sob condições controle ou salina (NaCl a 80 mM), pulverizadas com água destilada ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25mM), em 240 h. Nos géis, as setas em vermelho indicam menor abundância dos *spots* proteicos e as setas em azul maior. Os mapas foram obtidos usando tiras de gel de 13 cm com gradiente de pH 4-7 na focalização isoeletrica e géis de poliacrilamida a 12,5% na SDS-PAGE. Cada gel foi carregado com 400 µg de proteínas. Os *spots* proteicos foram visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

As análises dos padrões eletroforéticos 2D mostraram que os três tratamentos foram capazes de modificar os padrões de expressões das proteínas nas folhas de feijão-de-corda. Segundo Ngara e Ndimba (2014), o proteoma da planta é altamente dinâmico e suas respostas podem estar associadas a mudanças qualitativas ou quantitativas durante um tratamento. Essas mudanças no padrão de expressão são respostas as flutuações no ambiente externo da célula, na tentativa de restabelecer a homeostase. Segundo Kosová *et al.* (2011), as plantas redirecionam o seu metabolismo vegetal na tentativa de iniciar um processo de aclimação ao estresse.

### **7.2.5 Proteínas identificadas**

Das 82 proteínas diferencialmente expressas em resposta aos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e/ou NaCl, 74 proteínas foram selecionadas e submetidas à digestão com tripsina. Os peptídeos resultantes foram analisados por espectrometria de massa (ESI-Q-TOF MS/MS). Entre essas proteínas, 44 foram identificadas. Neste estudo foi realizada a identificação de 59 % das proteínas, através de pesquisas no banco de dados do NCBI e *SwissProt* usando o programa MASCOT. *ESTs (expressed sequence tags)* de *Vigna unguiculata*, bem como dados de proteínas de *Vigna radiata* e *Vigna angulares* também foram explorados.

### **7.2.6 Proteínas responsivas ao tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle**

Neste tratamento foram encontradas 10 proteínas com expressões aumentadas, enquanto que 6 tiveram suas expressões reduzidas. Dessas proteínas, 10 foram identificadas conforme mostrado na tabela abaixo (Tabela 7).

**Tabela 7** - Proteínas identificadas a partir das plantas de feijão-de-corda, cultivar TVu, que foram pulverizadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 mM) e permaneceram sob condições controle, em 240 horas.

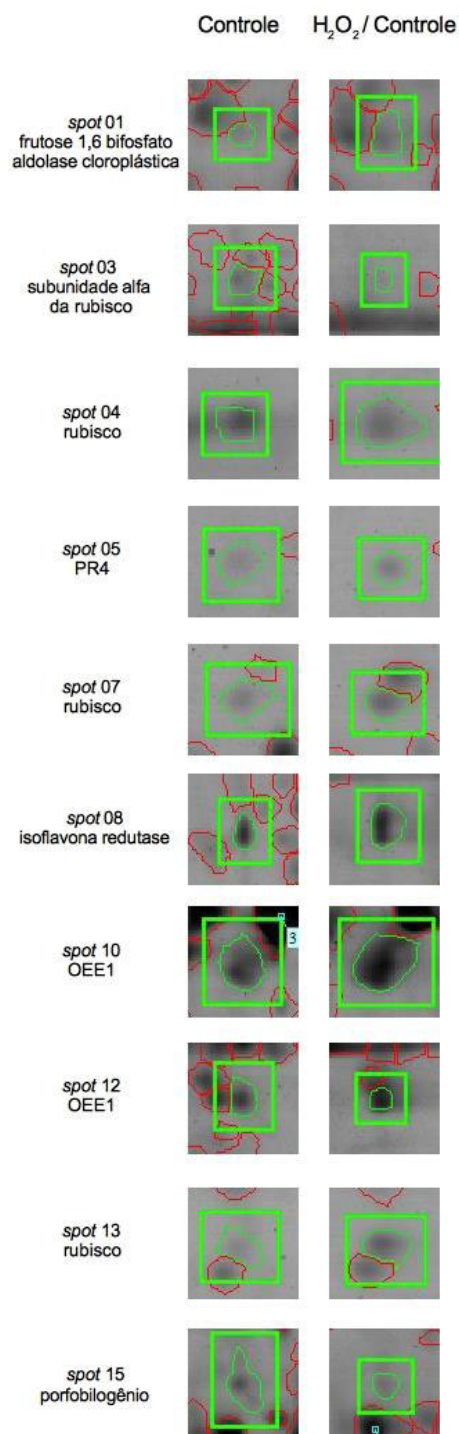
<b>Nº spot</b> <b>Cultivar</b> <b>(TVu)</b>	<b>Proteína</b> <b>[Espécie]</b>	<b>Nº de acesso</b> <b>(NCBI)</b>	<b>Sequência de peptídeos</b> <b>(MS/MS)</b>	<b>Cobertura</b> <b>da</b> <b>Sequência</b> <b>(%)</b>	<b>Mowse</b> <b>Score</b>	<b>pI/MM (kDa)</b> <b>Teórico</b>	<b>pI/MM (kDa)</b> <b>Experimental</b>
<i>spot 1</i>	Frutose-1,6 bisfosfato- aldolase cloroplástica [ <i>Vigna radiata</i> ]	XP_014524329,1	R.SAAYYQQGAR.F K.ASPQTVADYTLK.L	7	90	5,83/38011,16	5,78954/38010
<i>spot 3</i>	Subunidade alfa da Rubisco [ <i>Cicer arietinum</i> ]	XP_004506 047,1	R.GYISPQFVTNPEK.S	6	206	4,80/55466,60	5,68801/55460
<i>spot 4</i>	Rubisco [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	CAA42618,1	R.IIGFDNVR.Q	4	55	5,82/14567,745,69705/13157	
<i>spot 5</i>	PR-4 [ <i>Vigna radiata</i> ]	XP_014492110,1	R.TNAQITVR.I	*	*	5,81/13331,72	14,978/5,77
<i>spot 7b</i>	Subunidade maior da Rubisco [ <i>Vigna unguiculata</i> ]	O62964- SwissProt	K.LNYYTPEYETK.D K.LNYYTPEYETK.D K.DTDILAAFR.V	4	43	6,04/52833,99	5,68499/18473



<i>spot</i> 8	Isoflavona redutase [ <i>Glycine max</i> ]	XP_006581203,1 -Nr	K.VIILGDGNPK.A K.VIILGDGNPK.A	3	56	5,8/31806,36	4,76686/3497 0
<i>spot</i> 10	Proteína relacionada evolução do oxigênio (OEE1) [ <i>Vigna radiata</i> ]	XP_014521436,1	K.NAPLEFQNTK.L R.GASTGYDNAVALPAGGR. G R.GASTGYDNAVALPAGGR. G	8	101	5,13/30253,10	5,03351/3047 0
<i>spot</i> 12	Proteína relacionada a evolução do oxigênio (OEE1) [ <i>Vigna radiata</i> ]	XP_014521436,1	K.NAPLEFQNTK.L	8	108	5,12/30170,01	5,23861/30,17 8
<i>spot</i> 13	Subunidade maior da Rubisco [ <i>Vigna radiata</i> ]	AAV37474,1	K.LNYTPEYETK.D K.ASVVFKAGVK.D K.DTDILAAFR.V		53	6,18/51755,83	5,71314/1900 3
<i>spot</i> 15	Porfobilinogêni o [ <i>Vigna radiata</i> ]	XP_014521442,1 -swissprot	R.GSPLALAQAYETR.D K.ILSQPLADIGGK.G R.TPIAGYASR.N	9	109	5,55/34621,65	5,52011/4037 9

\*Encontrado no proteoma de referência

As proteínas identificadas representadas por seus *spots* podem ser observadas na imagem ampliada na Figura 13, onde percebe-se as diferenças nas variações das expressões. Por exemplo, o *spot* proteico 5 (PR4) foi o que teve sua expressão aumentada em 2,38 vezes, enquanto que o *spot* proteico 15 (porfobilinogênio) foi o que teve sua expressão reduzida em 5,99 vezes durante o tratamento (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /controle) em relação (água/controlado). Os *spots* proteicos (1, 4, 7, 8, 10, 12 e 13) foram identificados e tiveram suas expressões aumentadas, sendo esses respectivamente (frutose 1,6 bifosfato aldolase cloroplástica, 2,35 vezes), (rubisco, 1,42 vezes), (rubisco, 1,42 vezes), (isoflavona redutase, 1,42 vezes), (OEE1, 1,87 vezes), (OEE1, 1,93 vezes), (rubisco, 1,45 vezes) e o *spot* proteico 3 foi identificado como uma subunidade alfa da rubisco, e teve sua expressão reduzida em 2,28 vezes.



**Figura 13** - Detalhes dos *spots* proteicos que foram diferencialmente expressos e identificados no cultivar TVu, sob os tratamentos água/controle e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle.

As plantas têm desenvolvido mecanismos de tolerância cruzada para lidar com diferentes estresses (ZHANG *et al.*, 2012), entre eles está a síntese das proteínas relacionadas a patogênese (PR). As PRs estão divididas em duas classes, sendo compostas por 17 grupos de proteínas. Neste trabalho foi identificada uma PR4 com expressão aumentada, representada pelo *spot* 5. As PR4 são proteínas pertencentes à segunda classe e estão envolvidas em respostas de defesa contra vários estresses biótico e abióticos, embora não possuam o domínio que se liga a quitina (WANG; XIAO; XIONG, 2011). Em um estudo conduzido por Kim *et al.* (2014), foi

observado que a proteína PR4 acumulou no apoplasto, sendo induzida fortemente por moléculas de sinalização, tais como:  $H_2O_2$ , ABA, SA e JA. Portanto, é provável que o aumento dessa proteína, detectada aqui, ocorreu em resposta a aplicação da  $H_2O_2$  que atua como sinalizador, protegendo desta forma a célula.

Duas proteínas relacionadas a evolução do oxigênio do cloroplasto (OEE1) foram identificadas com suas expressões aumentadas, *spots* 10 e 12. Essas proteínas fazem parte do complexo de evolução do oxigênio (OEC), sendo localizadas no lado luminal do fotossistema II (YAMAMOTO; NISHIMURA, 1983, ZOUNI *et al.* 2001). Esse tipo de proteína é altamente conservada em cloroplastos de plantas superiores. Devido a sua estrutura estendida, ela consegue proteger outras proteínas, como a proteína D1 do centro de reação, contra radicais de oxigênio formados pela luz (YAMAMOTO, 2001). Portanto, seu aumento pode representar uma maior proteção para garantir a estabilidade do fotossistema II, em resposta ao tratamento realizado com  $H_2O_2$ /controle.

As subunidades da Rubisco foram identificadas nos *spots* 4, 7 e 13, e todas tiveram suas expressões aumentadas. É sabido que a Rubisco é responsável pela assimilação do  $CO_2$  atmosférico na fotossíntese. Portanto, é possível que o tratamento com  $H_2O_2$  pode ter ajudado na manutenção da assimilação de  $CO_2$ . Por outro lado, houve uma diminuição na expressão na subunidade *alfa* que se liga a subunidade maior da Rubisco, sendo representada pelo *spot* 3. Ela está envolvida na montagem da Rubisco em cloroplastos e sua diminuição pode indicar algum grau de proteólise.

A frutose 1,6-bifosfato aldolase cloroplástica identificada teve um aumento em sua expressão, representado pelo *spot* 1. Essa enzima possui duas isoformas: uma localizada no citosol e outra no cloroplasto. A enzima no cloroplasto é essencial ao ciclo de Calvin, em que sua atividade gera metabólitos para a biossíntese de amido (SONNEWALD *et al.*, 1994). Um estudo revelou que o aumento da frutose 1,6-bifosfato aldolase plastídica pode aumentar o crescimento plantas de tabaco. O aumento dessa enzima durante tratamento pode ter contribuído para a manutenção do crescimento em plantas de feijão-de-corda.

Neste estudo, uma isoflavona redutase foi identificada no *spot* 8, tendo sua expressão aumentada. O tratamento com  $H_2O_2$ /controle pode ter provocado um aumento na quantidade das EROS circulantes dentro da célula e, desta forma, induzido o aumento da isoflavona redutase, visto que ela pode atuar como enzima antioxidante. As plantas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários para conter os estresses ambientais gerados pelas EROS (GAPPER; DOLAN, 2006). Isoflavonóides são metabólitos secundários valiosos, que são produzidos principalmente em leguminosas. A família da isoflavona redutase está

envolvida no mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo, visto que contém um domínio que se liga ao NADPH, relacionado com a propriedade de oxidação/redução (BABYCHUK *et al.*, 1995, PETRUCCO *et al.*, 1996). Em um estudo conduzido por Babychuk *et al.* (1995) em *Arabidopsis*, foi proposto que a isoflavona redutase desempenha um papel importante como antioxidante. Kim *et al.* (2010), sugeriram que a isoflavona redutase pode agir como um regulador, evitando a elevação das EROS em arroz. Observaram também que a exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em folhas de arroz induzia a produção de substâncias antioxidantes.

Uma diminuição da expressão foi encontrada para o porfobilinogênio (PBG) (*spot* 15), uma das enzimas envolvidas na síntese de clorofila, podendo indicar que o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle pode ter levado à degradação desse pigmento. Sabe-se que a clorofila está diretamente envolvida na transformação de energia luminosa em plantas, sendo sua síntese mediada por mais de 17 enzimas (WETTSTEIN; GOUGH; KANNANGARA, 1995). O bloqueio de qualquer passo na biossíntese da clorofila pode provocar uma diminuição no teor dela. EROS podem ser geradas pela transferência direta da energia de excitação da clorofila para produzir oxigênio singlete ou da redução de oxigênio através da reação de Mehler nos cloroplastos. E que elas podem impedir o prosseguimento dos passos da síntese da clorofila, como é o caso, da transformação de porfobilinogênio (PBG) para uroporfirinogênio III (URO III) (SUN *et al.*, 2010).

### **7.2.7 Proteínas responsivas ao tratamento água/salino**

Neste tratamento, 28 proteínas tiveram suas expressões aumentadas, enquanto que 11 tiveram suas expressões reduzidas. Do total, vinte e uma proteínas foram identificadas, conforme mostrado na tabela abaixo (Tabela 8).

**Tabela 8** - Proteínas identificadas de folhas de plantas de feijão-de-corda, cultivar TVu, que foram pulverizadas com água e permaneceram sob condições salinas (NaCl 80 mM), em 240 horas.

Nº <i>spot</i> Cultivar (TVu)	Proteína [Espécie]	Nº de acesso (NCBI)	Sequência de peptídeos (MS/MS)	Cobertura da Sequência (%)	Mowse Score	pI/MM (kDa) Teórico	pI/MM (kDa) Experimental
<i>spot 17</i>	Subunidade alfa da Rubisco [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	XP_007132293,1 Nr	K.LGLLSVTSGANPVSLK.R K.TVLGLVEELEK.K K.VGAATETELEDK.R	6	218	4,8/55466,60	4,64348/65582
<i>spot 18</i>	Ascorbato peroxidase citosólica [ <i>Vigna unguiculata</i> ]	AAB03844,1	K.SYPTVSADYQK.A K.SYPTVSADYQK.A R.CAPLMLR.L K.TGGPFGTIK.H K.TGGPFGTIK.H R.EDKPEPPPEGR.L K.EGLLQLPSDK.A	19	194	5,73/26876,42	5,91739/26808
<i>spot 22</i>	Anidrase carbônica [ <i>Vigna unguiculata</i> ]	AFX73760,1 Nr	K.NPALYGELAK.G K.FMVFACSDSR.V R.NVANIVPPYDQSK.Y R.NVANIVPPYDQSK.Y R.NVANIVPPYDQSK.Y K.VSNIVVIGHSACGGIK.G K.GGYYDFVK.G	17	168	5,81/28376,28	7,05217/26315
<i>spot 23</i>	LCHII [ <i>Vigna unguiculata</i> ]	FG820309 EST	QVSSGSPWYGPDR QVSSGSPWYGPDR ELEVIHSR		109	4,88/25050,61	5/27006
<i>spot 24</i>	Subunidade menor da Rubisco [ <i>Vigna unguiculata</i> ]	AER24546,1 Nr	K.EIDYLLR.N K.EIDYLLR.N K.EIDYLLR.N	33	238	5,82/14567,74	6,18261/14594

			R.SPGYYDGR.Y R.TAHPNGFVR.I R.TAHPNGFVR.I R.TAHPNGFVR.I R.TAHPNGFVR.I R.TAHPNGFVR.I R.IIGFDNVR.Q R.IIGFDNVR.Q R.IIGFDNVR.Q R.IIGFDNVR.Q R.QVQCISFIAYK.A R.QVQCISFIAYK.A R.QVQCISFIAYK.A				
<i>spot 26</i>	Cognato de choque térmico 70 [ <i>Vigna radiata</i> ]	Q9LHA8	R.VEIIANDQGNR.T R.VEIIANDQGNR.T K.NAVVTVPAYFNDSQR.Q K.NAVVTVPAYFNDSQR.Q K.NKITITNDK.G K.ITITNDK.G	5	34	5,10/70923	4,92217/70000
<i>spot 27</i>	Cognato de choque térmico 70 [ <i>Vigna radiata</i> ]	XP_014497624,1 Nr	R.VEIIANDQGNR.T R.FSDTTVQSDVK.L R.EIAEAYLGSAVK.N	5	88	5,16/71076	4,98696/70655
<i>spot 29</i>	Ribose-5-fosfato isomerase 3, cloroplasmática	XP_014517024,1	KFIVVDDTKL	*	*	4,73 / 25219,88	4,43478/26193
<i>spot 31</i>	Ribose-5-fosfato-isomerase [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ].	AHA84257,1	R.SLGIPLSVLDDNPR.L R.LDLAIDGADEVDPDLNLVK.G KFIVVDDTKL	11	83	4,73/25219,88	4,53043/26193
<i>spot 32</i>	Ribonucleoproteína, 28 kDa cloroplástica	KOM32736,1	K.EAGTVEVAEVIYNR.V R.GFGFVTMSTLEEVEK.A	14	113	4,54/25278,69	3,93043/27906

	[ <i>Phaseolus vulgaris</i> ] Nr		R.IYVGNLPWTVDNAR.L				
<i>spot 33</i>	Subunidade maior da Rubisco [ <i>Vigna unguiculata</i> ]	YP_006460327,1 Nr	K.LNYYTPEYETK.D K.LNYYTPEYETK.D K.TFQGPPHGIQVER.D K.TFQGPPHGIQVER.D R.GGLDFTKDDENVNSQPFMR.W R.GGLDFTKDDENVNSQPFMR.W K.DDENVNSQPFMR.W K.DDENVNSQPFMR.W K.DDENVNSQPFMR.W K.SQAETGEIK.G R.DNGLLLHIHR.A R.AMHAVIDR.Q R.AMHAVIDR.Q R.AMHAVIDR.Q R.LSGGDHVHSGTVVGK.L R.LSGGDHVHSGTVVGK.L R.DDFVEKDR.S R.VALEACVK.A R.EGNEIIR.E K.WSPELAAACEVWK.E K.WSPELAAACEVWK.E R.IPTAYIK.T	20	529	6,04/52702,79	6,31739/51801
<i>spot 34</i>	Proteína choque térmico [ <i>Vigna radiata</i> ]	XP_014518378,1	R.TPVENSLR.D	*	*	4,91/66863,43	4,56957/67127
<i>spot 37</i>	Pirofosfatase inorgânica	XP_014518679, 1	K.IVAISLDDPK.A K.ASLVNDVNDVEK.H	14	145	4,93/26275,67	4,80435/31165

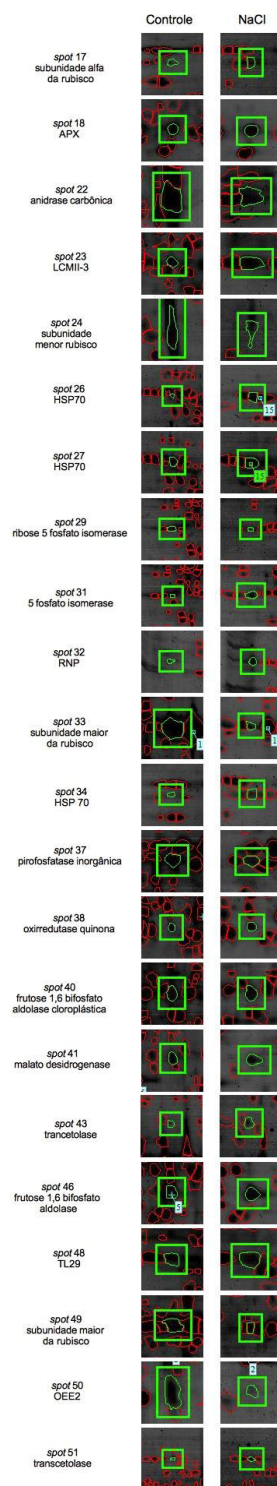


	cloroplasmática [ <i>Vigna radiata</i> ]	Nr	K.ASLVNDVNDVEK.H K.FGLGNQAANK.E K.FGLGNQAANK.E K.VITETNESWNK.L				
spot 38	Quinona oxidorreductase cloroplasmática [ <i>Glycine max</i> ]	FG842200,1 EST	K.VAAASINPIDYK.R K.VIGSLAEYTAEEER.L	135	5,86/34195,26	5,97826/35341	
spot 40	Frutose-1,6 bifosfato aldolase, cloroplasmática [ <i>Vigna angularis</i> ]	KOM42294,1 Nr	R.LASIGLENTEANR.Q R.SAAYYTQGAR.F K.EAAWGLAR.Y R.ATPQQVSDYTLK.L R.ATPQQVSDYTLK.L R.ALQNTCLK.T R.ALQNTCLK.T K.AAQDALLFR.A K.AAQDALLFR.A K.AAQDALLFR.A K.SNSLAQLGK.Y K.SNSLAQLGK.Y	17	361	5,46/37818,93	5,56087/38010
spot 41	Malato- desidrogenase citoplasmática [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	Q9SML8	R.ALGQISER.L R.ALGQISER.L K.EFAPSIPEK.N K.VLVVANPANTNALILK.E K.VLVVANPANTNALILK.E	9	70	5,91/35424,76	6,31739/40006
spot 46b	Frutose-1,6 bisfosfato aldolase cloroplasmática [ <i>Glycine max</i> ]	XP_003537836,1 Nr	R.GILAMDESNATCGK.R R.GILAMDESNATCGK.R R.LASIGLENTEANR.Q R.LASIGLENTEANR.Q R.SAAYYQQGAR.F R.SAAYYQQGAR.F	21	474	5,83/38011,16	6,16522/37386

			K.ASPQTVADYTLK.L K.ASPQTVADYTLK.L K.ASPQTVADYTLK.L R.ALQNTALK.T K.AAQDALLFR.A K.AAQDALLFR.A K.SNSLAQLGK.Y K.YTGEGESEEA.K K.YTGEGESEEA.KK.E K.YTGEGESEEA.KK.E				
spot 48b	TL29 [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	XP_007141212,1 Nr	R.ADAQDPDPEGR.V	3	59	5,73/34255,54	5,03719/25974
spot 49b	Subunidade maior da Rubisco [ <i>Vigna unguiculata</i> ]	O62964 Swissprot	K.LNYYTPEYETK.D R.AVYECLR.G R.AMHAVIDR.Q	5	54	6,04/52833,99	6,1/52564
spot 50b	Proteína relacionada a evolução do oxigênio (OEE2) cloroplasmática [ <i>Vigna radiata</i> ]	XP_014504521,1	KEVEYTGQVLRV	*	*	6,82 / 24377,31	6,33913/21805
spot 51	Transcetolase do cloroplasto [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	XP_007142668,1 Nr	K.NGNTGYDEIR.A K.ALPTYTPESPADATR.N	3	99	5,59/73230,73	5,86957/75415

\*Encontrado no proteoma de referência

As proteínas identificadas representadas por seus *spots* podem ser observadas na imagem ampliada na Figura 14, onde percebe-se as diferenças nas variações das expressões. Por exemplo, o *spot* proteico 34 (HSP70) foi o que teve sua expressão aumentada em 4,94 vezes, enquanto que o *spot* proteico 22 (anidrase carbônica) foi o que teve sua expressão reduzida em 4,23 vezes durante o tratamento (água/salino) em relação (água/controle). Os *spots* proteicos (16, 17, 23, 26, 27, 31, 32, 38, 40, 41,43, 46, 48 e 51) foram identificados e tiveram suas expressões aumentadas, sendo esses respectivamente (APX, 2,42 vezes), (subunidade alfa da rubisco 4,78 vezes), (LCHII -3, 2,93 vezes), (HSP70, 4,70 vezes), (HSP70, 3,00 vezes), (5 fosfato isomerase cloroplástica, 3,53 vezes), (RNPs 4,42 vezes), (quinona oxireductase, 4,45 vezes), (frutose 1,6 bifosfato aldolase, 1,50 vezes), (malato desidrogenase, 1,61 vezes), (transcetolase, 1,68 vezes), (frutose 1,6 bifosfato aldolase, 1,88 vezes), (TL29, 1,71 vezes) e (transcetolase, 1,40 vezes) enquanto que os *spots* proteicos (24, 29, 33, 37, 49 e 50) foram identificados e tiveram suas expressões diminuídas, sendo esses respectivamente (subunidade menor da rubisco, 2,81 vezes), (ribose 5 fosfato isomerase, 2,86 vezes), (subunidade maior da rubisco, 2,50 vezes), (pirofosfatase inorganica, 1,78 vezes), (subunidade maior da rubisco, 1,86 vezes) e (proteína OEE2, 2,32 vezes).



**Figura 14** - Detalhes dos *spots* proteicos que foram diferencialmente expressos e identificados no cultivar TVu, sob os tratamentos água/controle e água/salino

Algumas proteínas associadas com a fotossíntese mostraram expressões diferenciadas nas folhas, sob estresse salino. Diferentes subunidades da Rubisco diminuíram suas expressões sob essa condição de estresse. Estas subunidades corresponderam aos *spots* 33 e 49 (subunidade grande) e *spot* 24 (subunidade pequena). Na fotossíntese, a Rubisco catalisa a carboxilação dos cinco carbonos da ribulose 1,5-bisfosfato, mediando assim a conversão do CO<sub>2</sub> em açúcares utilizáveis. A enzima é formada por oito subunidades grandes e pequenas

(SPREITZER; SALVUCCI, 2002; ANDERSSON; BACKLUND, 2008). Sabemos que o estresse salino pode gerar estresse osmótico, levando ao fechamento estomático e reduzindo a assimilação do CO<sub>2</sub>. Ademias, como já foi observado em várias culturas expostas ao sal, esse estresse é capaz de elevar a produção das EROS que, por conseguinte, pode ter degradado as subunidades da enzima (AGHAEI *et al.* 2008; PANG *et al.* 2010; SOBHANIAN *et al.* 2010; BANDEHAGH *et al.* 2011; CHATTOPADHYAY *et al.* 2011). A degradação das subunidades da Rubisco pode estar associada aos mecanismos dependente ou independente de protease (SALEKDEH; KOMATSU, 2007). Nesse contexto, um caso de mecanismo de degradação independente de protease, foi observado em trigo, que a exposição a alta intensidade de luz levou ao estresse oxidativo, que por sua vez, levou à degradação da subunidade maior da Rubisco mediado pelo radical hidroxil (ISHIDA; MAKINO; MAE, 1999). Várias proteínas relacionadas ao ciclo de Calvin são constantemente moduladas pelo estresse salino, particularmente as subunidades grande e pequena da Rubisco, que podem sofrer variações, pois elas compõem uma das enzimas mais abundante na célula. Por essa razão, estima-se que elas sejam um alvo fácil para as EROS, levando a sua degradação, portanto comprometendo a assimilação de CO<sub>2</sub>.

Por outro lado, também foi verificado um aumento na expressão (4,78 vezes) da proteína *alfa* que se liga a subunidade maior da Rubisco, correspondendo ao *spot* 17. Ela está envolvida na montagem da Rubisco em cloroplastos de plantas superiores. A montagem da subunidade maior da Rubisco depende do estado de agregação do complexo de proteína que se ligada subunidade maior (KIM *et al.*, 2005). Sua expressão aumentada sob estresse salino, pode indicar uma tentativa de montagem da subunidade maior, para tentar manter o processo de carboxilação durante o estresse salino.

A enzima anidrase carbônica foi identificada no *spot* 22. A anidrase carbônica é uma metaloenzima que catalisa a interconversão do CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O em HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sup>+</sup>. Além disso, ela funciona em uma variedade de processos biológicos, incluindo a regulação do pH, transferência de CO<sub>2</sub>, troca iônica, respiração, biossíntese e a fixação de CO<sub>2</sub> fotossintético (YU *et al.*, 2007). No presente estudo, o estresse salino causou uma redução na expressão dessa enzima de até 4,23 vezes. Sabe-se que o estresse salino leva à redução da assimilação de CO<sub>2</sub>. A redução dele pode modular a produção da enzima. Corroborando com esse resultado, Abreu *et al.* (2014) ao realizar o tratamento salino em plantas de feijão, cultivar TVu, na análise proteômica verificaram que esse estresse foi capaz de reduzir a expressão da anidrase carbônica.

Outra proteína relacionada a fotossíntese que teve sua expressão alterada pelo estresse salino foi a LHCII - 3, que mostrou expressão aumentada em 2,93 vezes (*spot* 23).

Sabe-se que a fotossíntese é um processo químico, que utiliza a energia da luz solar para a produção de compostos orgânicos. Nos cloroplastos, há um complexo de proteínas-pigmentos (LHCII) altamente conservado, que coleta luz do exterior para o centro de reação do fotossistema II (PSII) (KIM *et al.*, 2009). O complexo de proteínas-pigmentos (LHCII) constituem as proteínas de membranas mais abundante na Terra, sendo um heterotrímero composto por monômeros, como Lhcb1, Lhcb2 e Lhcb3 associados em diferentes formas (CAFFARRI *et al.*, 2004; JANSSEN, 1999). Os monômeros estão ligados por oito clorofilas a, seis clorofilas b e quatro carotenóides, como duas luteínas, uma neoxantina e uma violaxantina (LIU *et al.*, 2004). O LHCII trimérico está envolvido na coleta de luz para o fotossistema II (PSII) (CROCE; VAN AMERONGEN, 2011; WIENTJES *et al.*, 2013), contra o fotodano e na dissipação da luz absorvida em excesso (MÜLLER *et al.*, 2001, RUBAN *et al.*, 2012). Isso indica que o aumento da abundância dessa proteína, poderia ajudar na captação de luz e transferência de elétrons nas plantas ou mesmo uma proteção contra algum dano durante o estresse salino. De forma semelhante, o trabalho conduzido por MA *et al.* (2012), encontrou um aumento da LHCII para soja, mas no estágio inicial do estresse salino.

O tratamento água/salino reduziu a expressão da OEE2 cloroplástica em 2,32 vezes, em relação ao tratamento água/controle, sendo representado pelo *spot* 50. Essa proteína faz parte de um grupo, chamado de proteínas estimuladoras da evolução do oxigênio, que consistem de três subunidades (OEE1, OEE2 e OEE3). Elas são proteínas do cloroplasto codificadas pelo núcleo e perifericamente ligada ao fotossistema II (PSII,) no lado luminal da membrana de tilacóide (SUGIHARA *et al.*, 2000). A função principal destas proteínas é aumentar a eficácia do complexo em evolução de oxigênio. A OEE 2 pode ser removida facilmente a partir do complexo PSII na presença de NaCl. Já que sob condições de estresse a demanda por elétrons é reduzida, as reações fotoquímicas tende a acompanhar essa redução, como foi visto pela redução da OEE2, indicando uma tendência na redução da atividade do complexo de evolução no PSII.

Neste trabalho, o *spot* 32 foi identificado como sendo uma ribonucleoproteína (RNP) de 28 kDa do cloroplasto. Ela teve sua expressão aumentada durante o estresse salino. A expressão dos genes do cloroplasto é regulada por essas RNPs. Elas estão envolvidas no processamento de RNA. Elas estão associadas com o processamento final da região 3', além de mediar a estabilização do RNAm de cloroplastos na região 3' UTR. A depleção de 28RNP nos cloroplastos interfere com o correto processamento final 3' dos RNAs mensageiros e resulta em uma rápida degradação de RNAm alvo do cloroplasto (SCHUSTER; GRUISSEM, 1991).

Logo, o aumento dessa ribonucleoproteína pode indicar uma proteção contra os danos causados pelo estresse salino, durante o processamento do RNAm dentro dos cloroplastos.

A frutose 1,6-bifosfato aldolase cloroplástica foi identificada nos *spots* 40 e 46, apresentando expressões aumentadas. Essa enzima existe em duas isoformas, a cloroplástica é uma enzima essencial no ciclo de Calvin e sua atividade gera metabólitos para a biossíntese de amido. Como já discutido anteriormente a frutose 1,6-bifosfato aldolase, no ciclo de Calvin, contribui para a regeneração da ribulose 1,5-bifosfato, e na glicólise plastídica, que proporciona precursores para a síntese de aminoácidos e ácidos graxos. O aumento na acumulação desta enzima na glicólise pode estar associado ao aumento da necessidade energética requerida pela planta, durante o estresse salino para realização de respostas que promovam sua aclimação. A acumulação dessa enzima cloroplástica em tabaco pode aumentar a tolerância ao sal, através do aumento do conteúdo de prolina (YAMADA *et al.*, 2000).

Uma proteína envolvida na regulação de íons é a pirofosfatase inorgânica do cloroplasto, correspondendo ao *spot* 37. Ela fornece energia para o transporte de Na<sup>+</sup> para o vacúolo e outros tecidos através do antiporte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (HASEGAWA *et al.*, 2000). Como houve uma diminuição na proteína durante o estresse salino, isso pode propiciar um excessivo acúmulo de Na<sup>+</sup>.

A enzima malato desidrogenase citoplasmática foi identificada no *spot* 41 e sua expressão aumentou durante o estresse salino. A malato desidrogenase (MDH) é uma enzima altamente conservada, que pode ser encontrada em plantas. MDH catalisa a conversão reversível do malato em ácido oxalacético (OAA) que está associado com a oxidação / redução da coenzima dinucleotídica. Geralmente a MDH de vegetais pode ser classificada em cinco classes, entre elas está a MDH citoplasmática dependente de NAD<sup>+</sup>. A MDH citoplasmática faz parte de diversos sistemas de transporte, para a troca de substratos e equivalentes redutores entre o citoplasma e as organelas. Particularmente, ela converte o malato em aspartato bem como o malato em oxaloacetato. O aumento dessa enzima, sugere que o ciclo de Krebs está ativo, pois está promovendo a conversão do malato no intermediário oxaloacetato. Durante sua produção há formação de cofator reduzido (NADH), que por sua vez será oxidado em outros ciclos importantes na célula. Portanto, tanto a produção do NADH como a de oxaloacetato (OAA) podem ser utilizados em outras vias necessárias para a aclimação da planta durante o estresse salino. A importância da malato desidrogenase citoplasmática durante a tolerância ao estresse salino em maçã já foi enfatizada (YAO *et al.*, 2011).

Neste estudo, a ribose 5-fosfato isomerase 3, cloroplástica foi identificada (*spot* 29). A via da pentose fosfato tem um papel importante na resposta a estresse ambiental, e consiste

em duas fases distintas: a fase oxidativa e a fase não-oxidativa (DENNIS; BLAKELEY, 2000). A fase oxidativa gera NADPH e outros intermediários para biossíntese e manutenção do potencial redox na célula (DENNIS; BLAKELEY, 2000). Na fase não-oxidativa, a ribose 5-fosfato isomerase é a primeira enzima que utiliza a ribulose 5-fosfato que foi gerada da via oxidativa convertendo-a em ribose 5-fosfato. A ribose 5-fosfato e a eritrose 4 fosfato são utilizadas para a síntese de nucleotídeos, aminoácidos aromáticos, fenilpropanóides, que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta (XIONG *et al.*, 2009). A enzima foi encontrada no *spot* 31 com expressão aumentada de 3,53 vezes durante o estresse salino. Isso indica que a enzima pode ter contribuído indiretamente para manutenção de NADPH na célula, visto que na via não-oxidativa a glicose 6-fosfato é regenerada e também para produção da ribose-5-fosfato e eritrose 4 fosfato que são importantes para o crescimento e desenvolvimento da plantas, mesmo durante o estresse salino. Além de ser importante na via das pentoses fosfato oxidativa no citosol, a enzima também está presente no cloroplasto. A ribose 5-fosfato isomerase 3 é essencial para o funcionamento do ciclo de Calvin, pois convertendo a ribose-5-fosfato para ribulose 5-fosfato essa pode ser fosforilada formando ribulose 1,5-bifosfato, que é aceptora do CO<sub>2</sub>. No ciclo de Calvin, a ribose 5-fosfato isomerase forma um complexo funcional com outras enzimas, incluindo a Rubisco na membrana do tilacoide do cloroplasto (SUSS *et al.*, 1993). Neste estudo, a ribose 5-fosfato isomerase 3, cloroplástica diminuiu durante o estresse salino, provavelmente prejudicando indiretamente a fixação do CO<sub>2</sub> e crescimento.

A transcetolase do cloroplasto é uma enzima chave para o metabolismo do carbono nas plantas, devido ao seu papel anfibólico tanto no ciclo de Calvin, como na via das pentoses fosfato oxidativa. Durante a fixação do carbono, a transcetolase catalisa duas reações dentro da parte regenerativa do ciclo de Calvin, especificamente a formação de frutose 6-fosfato a partir de sedoepulose 7-fosfato com gliceraldeído 3-fosfato, levando à formação, entre outros produtos da xilulose 5-fosfato. Posteriormente, essa é isomerizada para ribulose 5-fosfato sendo fosforilada, e produzindo ribulose 1,5-bisfosfato. Dentro da via das pentoses fosfato oxidativa, a enzima catalisa as mesmas reações, na direção oposta do ciclo de Calvin (KRUGER; SCHAEWEN, 2003). As pentoses fosfatos criadas podem ser utilizadas por outras vias metabólicas, tais como: a da ribose 5-fosfato, para a síntese de nucleotídeos e de tiamina ou eritrose 4-fosfato via do ácido chiquímico para a produção de aminoácidos aromáticos, bem como pode servir de precursores de metabólitos secundários envolvidos na defesa das plantas e sinalização (DIXON; PAIVA, 1995). Neste estudo foram identificadas duas transcetolases (*spot* 51 e 43) apresentando expressões aumentadas. Os dados aqui encontrados, sugerem que o aumento dessa enzima poderia estar relacionado com uma tentativa de manutenção do ciclo



de Calvin mesmo durante o estresse salino provavelmente permitindo a formação de pentoses fosfato.

O estresse salino pode causar o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), levando a danos na célula. Assim, as plantas tentam barrar esses danos através da utilização do sistema antioxidante. Neste estudo, foi identificada uma ascorbato peroxidase (APX) (*spot* 18) com expressão aumentada, embora não se tenha observado mudança na atividade total dessa enzima (Figura 8). Provavelmente durante o estresse salino houve alteração na homeostase redox e a presença da enzima poderia atenuar os efeitos nocivos das EROS. Este resultado foi similar aos encontrados por Ji *et al.* (2016) e por Du *et al.* (2010). Outra enzima identificada foi a TL29 que sofreu aumento, representada pelo *spot* 48. Devido sua homologia de sequência com a ascorbato peroxidase a TL29 foi renomeado para APX4 por Panchuk *et al.* (2005) e Mittler *et al.* (2004). Nos cloroplastos das plantas superiores, há duas isoformas da APX, sendo uma localizada no estroma e a outra ligada à membrana do tilacóide (JESPERSEN *et al.*, 1997; KITAJIMA *et al.*, 2008). A necessidade de uma peroxidase no lúmen do tilacóide é fundamental, pois está próximo ao complexo de evolução do oxigênio, onde ocorre produção das EROS. Entretanto, em um estudo conduzido por Granlund *et al.* (2009), foi relatado que a TL29 não tem a capacidade de se ligar ao ascorbato ou grupo heme, dessa forma não possui atividade de peroxidase. Apesar da sua alta homologia com a ascorbato peroxidase (GRANLUND *et al.*, 2009), a TL29 provavelmente perdeu a função de peroxidase e foi recrutada para outras funções no cloroplasto, e sugere que ela é associada ao PSII funcionando como uma chaperona (SUORSA *et al.*, 2014). Lindahl *et al.* (2011), relata que a TL29 pode ser regulada via interação com a tiorredoxina, que tem um mecanismo de mediar a luz na fotossíntese. Portanto, ela pode estar envolvida na proteção redox no cloroplasto.

O estresse salino também provoca um aumento de várias proteínas com funções de proteção, como as *Heat Shock Proteins* (HSP). Sabe-se que o dobramento e processamento é necessário para o bom funcionamento das proteínas. Nas plantas, as HSPs funcionam prevenindo a agregação da proteína, dando assistência como acompanhantes e no seu enovelamento sob condições de estresse (WANG *et al.*, 2004). A proteína de 70 kDa (HSP70) cognata de choque térmico foi identificada nos *spots* 26 e 27 aumentando suas expressões em 4,7 e 3,0 vezes, respectivamente, durante o estresse salino. Ainda nesse cenário, outra proteína foi identificada, no *spot* 34, como uma HSP 70 kDa do cloroplasto, chegando a um aumento de 4,94 vezes durante o estresse salino. No presente estudo, o aumento das HSP 70 kDa no citoplasma e no cloroplasto, sugere que as proteínas presentes nestas localizações sofreram modificações durante o estresse salino. Da mesma forma, Beritognolo *et al.* (2011), observaram

aumento da expressão de uma HSP70 induzida por sal, sendo demonstrado contribuir para a tolerância a salinidade num cultivar de *Poplar*.

Os lipídios são particularmente propensos à oxidação, que pode ocorrer através dos processos enzimáticos e não-enzimáticos (devido as EROS). Esses processos levam a peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, acumulando alguns produtos, como carbonil  $\alpha$ , b-insaturados, gerados pelo estresse oxidativo (ANDREOU *et al.*, 2009; BLEE, 1998, 2002; FARMER; DAVOINE, 2007; LEONARDUZZI *et al.*, 2000; MUELLER; BERGER, 2009). O carbonil  $\alpha$ , b-insaturado é uma molécula reativa e tóxica, devido à sua capacidade de se ligar a cisteína, lisina, histidina e ácidos nucleicos (BLAIR, 2008; ESTERBAUER *et al.*, 1991). Em plantas, os ácidos graxos poli-insaturados nas membranas dos cloroplastos são os mais propensos à oxidação, devido à atividade fotossintética e mecanismos enzimáticos específicos da peroxidação (SCHALLER; STINTZI, 2009; YAMAUCHI *et al.*, 2008; ZOELLER *et al.*, 2012). Os mecanismos plastidiais de desintoxicação dos produtos da oxidação dos lipídios envolvem enzimas, como a quinona oxidoredutase (YAMAUCHI *et al.*, 2012, 2011). Esta proteína está envolvida na redução dependente de NADPH, da ligação dupla de cadeias carbônicas de alcenos ou cetonas, com uma preferência para o carbonil  $\alpha$ , b-insaturados, em moléculas de cadeia carbônica maior que 9. Neste trabalho, foi identificada a quinona oxidoredutase cloroplástica correspondendo ao *spot* 38, onde sua expressão estava aumentada. Esse aumento indica uma participação na desintoxicação dos produtos tóxicos devido a oxidação lipídica durante o estresse salino.

### **7.2.8 Proteínas responsivas ao tratamento $H_2O_2$ /salino**

Neste tratamento 19 proteínas tiveram suas expressões aumentadas, enquanto que 9 foram reduzidas. Dessas 13 proteínas foram identificadas conforme mostrado na Tabela 9.

**Tabela 9** - Proteínas identificadas de folhas de plantas de feijão-de-corda, cultivar TVu, que foram pulverizadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 mM) e permaneceram sob condições salinas (NaCl 80 mM), em 240 horas.

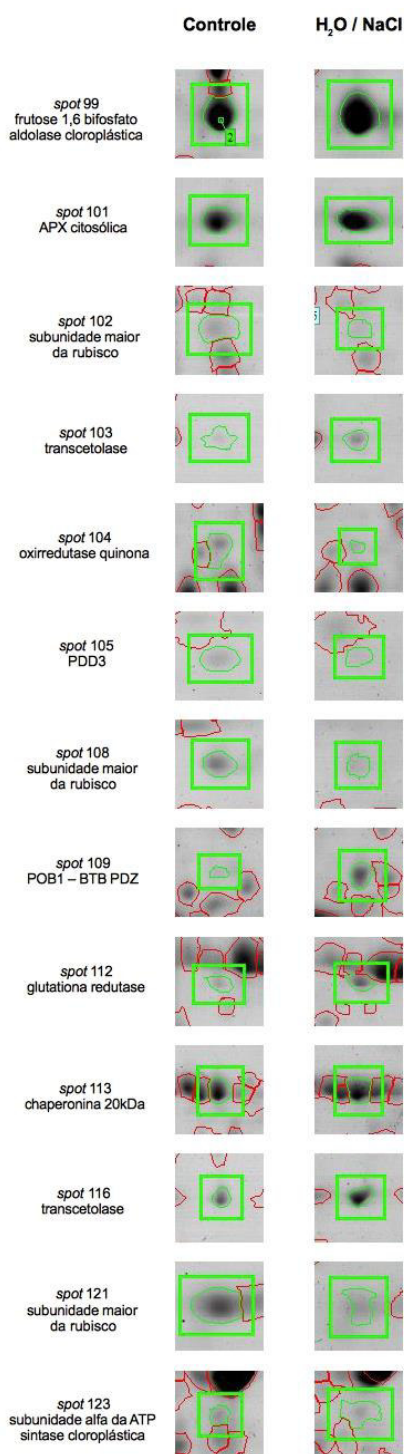
Nº <i>spot</i> Cultivar (TVu)	Proteína [Espécie]	Nº de acesso (NCBI)	Sequência de peptídeos (MS/MS)	Cobertura da Sequência (%)	Mowse Score	pI/MM (kDa) Teórico	pI/MM (kDa) Experimental
<i>spot</i> 99	Futrose-1,6 bisfosfato aldolase cloroplastica [ <i>Glycine max</i> ]	XP_003537836,1	R.GILAMDESNATCGK.R R.GILAMDESNATCGK.R R.LASIGLENTEANR.Q R.LASIGLENTEANR.Q R.SAAYYQQGAR.F R.SAAYYQQGAR.F K.ASPQTVADYTLK.L K.ASPQTVADYTLK.L K.ASPQTVADYTLK.L R.ALQNTALK.T K.AAQDALLFR.A K.AAQDALLFR.A K.SNSLAQLGK.Y K.YTGEGESEEEK.K K.YTGEGESEEEK.E K.YTGEGESEEEK.E	21	474	5,83/3801 1,16	6,16522/37386
<i>spot</i> 101	Ascorbate peroxidase citolsolica [ <i>Vigna unguiculata</i> ]	AAB03844,1	K.SYPTVSADYQK.A K.SYPTVSADYQK.A R.CAPLMLR.L K.TGGPFGTIK.H K.TGGPFGTIK.H R.EDKPEPPPEGR.L K.EGLLQLPSDK.A	19	194	5,73/2687 6,42	5,91739/26808

spot 102	Subunidade maior da Rubisco (cloroplastos) [ <i>Phaseolus polystachios</i> ]	AKG4913 3,1	LTYYTPEYETK K.DTDILAAFR.V K.AQAETGEIK.G	6	87	6,17/5265 8,85	6,58393/3 4195
spot 103	Transcetolase, cloroplástica [ <i>Phaseolus vulgaris</i> ]	XP_00714 2668,1	K.NGNTGYDEIR.A K.ALPTYTPESPADATR.N	3	99	5,59/7323 0,73	5,86957/7 5415
spot 104	Oxidoredutase cloroplasmático [ <i>Vigna radiata</i> ]	XP_01452 2275,1	RIYTPEFLTRL	*	*	5,83/3816 7,25	6,12119/4 3421
spot 105	PDD3 do cloroplasto	XP_01450 0264,1	K.VDEFAQTLVSGGLDR.S	*	*	4,94/2019 6,5	4,91186/1 6067
spot 108	Subunidade maior da Rubisco [ <i>Cercidiphyllu m japonicum</i> ]	Q05987	K.DTDILAAFR.V K.AQAETGEIK.G K.AQAETGEIK.G K.APGAVAGRVALEACVQAR.N K.APGAVAGRVALEACVQAR.N K.APGAVAGRVALEACVQAR.N	7	31	6,04/5283 3,99	4,8107/25 193
spot 109	POB1 domínio BTB/POZ [ <i>Vigna radiata</i> ]	XP_01451 5347,1	K.VVEFELPRQQCVVYLDLK.R	*	*	5,78/5012 5,28	5,728/484 79
spot 112	Glutationa redutase [ <i>Vigna unguiculata</i> ]	ABB8904 2,1	R.GMGSEVDLVFR.K R.LNLEAVGVEVDK.A	4	105	5,72/5381 7,61	6,30979/5 3818

<i>spot</i> 113	Chaperonina 20 kDa cloroplástica [ <i>Vigna radiata</i> ]	XP_01449 8406,1	KTAGGLLLTEATKE	*	*	5,63/21,3 34,49	5,07902/6 9699
<i>spot</i> 116	Transcetolase, cloroplástica [ <i>Glycine max</i> ]	XP_00353 6788,1	K.NGNTGYDEIR.A K.NGNTGYDEIR.A K.VTTTIGFGSPNK.A K.ALPTYTPESPADATR.N K.ALPTYTPESPADATR.N R.FGASAPAGK.I	6	245	5,59/7323 0,73	5,90055/7 2770
<i>spot</i> 121	Subunidade menor da Rubisco [ <i>Vigna unguiculata</i> ]	AER2454 6,1	K.EIDYLLR.N K.EIDYLLR.N R.SPGYYDGR.Y K.LPMFGCTDATQVLQEVVEAR.T K.LPMFGCTDATQVLQEVVEAR.T K.LPMFGCTDATQVLQEVVEAR.T R.IIGFDNVR.Q R.QVQCISFIAYK.A R.QVQCISFIAYK.A K.KFETLSYLPDLTEEQLLK.E		291	5.82 / 14567,74	5,57291/1 2831
<i>spot</i> 123	ATP sintase (subunidade alfa) do cloroplasto	A4GGB2	R.LIESPAPGIISR.R	2	307	5,28/5571 4,83	5,58066/4 2135

\*Encontrado no proteoma de referência

As proteínas identificadas representadas por seus *spots* podem ser observadas na imagem ampliada na Figura 15, onde percebe-se as diferenças nas variações das expressões. Por exemplo, o *spot* proteico 109 (POB1 - BTB POZ) foi o que teve sua expressão aumentada em 4,75 vezes, enquanto que o *spot* proteico 104 (oxirredutase) foi o que teve sua expressão reduzida em 2,13 vezes durante o tratamento (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /salino) em relação (água/controle). Os *spots* proteicos (99, 101, 103, 112, 113, 116 e 123) foram identificados e tiveram suas expressões aumentadas, sendo esses respectivamente (frutose-1,6-bifosfato aldolase cloroplástica, 1,70 vezes), (APX citosólica, 1,54 vezes), (transcetolase,, 2,34 vezes), (glutathiona redutase, 1,74 vezes), (chaperonina 20 kDa, 1,54 vezes), (transcetolase, 2,07 vezes) e (subunidade alfa da ATP sintase cloroplástica, 1,60 vezes,) e os *spots* proteicos ( 102, 105, 108 e 121) foram identificados e tiveram suas expressões reduzidas, sendo esses respectivamente: (subunidade maior da rubisco, 2,05 vezes), (PDD3, 2,86 vezes), (subunidade maior da rubisco, 1,81 vezes) e (subunidade menor da rubisco, 1,61 vezes).



**Figura 15** - Detalhes dos *spots* proteicos que foram diferencialmente expressos no cultivar TVu, sob os tratamentos água/controle e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino.

De forma semelhante ao tratamento salino, o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino revelou proteínas relacionadas à fotossíntese, especialmente as subunidades da Rubisco. As subunidades maiores foram identificadas como os *spots* 102 e 108 e a subunidade menor como o *spot* 121. Todas tiveram suas expressões diminuídas. Tendo em vista que a Rubisco é responsável pela assimilação do CO<sub>2</sub> atmosférico pode-se especular sobre alguns eventos que estejam ocorrendo com essa enzima em virtude do estresse salino. Esse estresse pode limitar a assimilação de CO<sub>2</sub> devido o fechamento estomático, dessa forma, isso poderia induzir a

redução da quantidade da enzima. Outra possibilidade seria a redução enzimática decorrente da proteólise. Nesse contexto, Johansson *et al.* (2004) e Job *et al.* (2005) verificaram que a Rubisco pode ser um alvo preferencial de EROS em *Arabidopsis*.

A subunidade alfa da ATP sintase cloroplástica foi identificada no *spot* 123 revelando uma expressão aumentada. Essa enzima é formada por um complexo de multi-subunidades localizada na membrana do tilacóide, sendo responsável pela produção de ATP, na fase fotoquímica da fotossíntese, através de um gradiente eletroquímico de prótons transmembrana (BALLMOOS; WIEDENMANN; DIMROTH, 2009). A ATP sintase é composta de dois subcomplexos com funcionalidades distintas: a secção hidrofóbica  $F_0$  está integrada a membrana atuando no transporte de prótons através dela, e a secção hidrofílica  $F_1$  que fica imersa no estroma correspondendo a porção catalítica da enzima. A ATP sintase dos cloroplastos é montada a partir de uma combinação de subunidades codificadas pelo núcleo e pela organela (MAO *et al.*, 2015). Durante a biogênese da enzima, todos os fatores são importantes para sua montagem, uma vez que complexos intermediários podem desacoplar o gradiente de prótons ou desperdiçar o ATP (GRAHL *et al.*, 2016). Durante o estresse salino há mudanças metabólicas e isso exige uma demanda por ATP, então o aumento dessa enzima sugere uma ativação do metabolismo energético. Seguindo esse comportamento, Wang *et al.* (2015), também observaram aumento da subunidade alfa da ATP sintase em *Kandelia candel* durante o estresse salino.

A proteína PPD3 foi identificada no *spot* 105, onde sua expressão foi diminuída. A proteína PPD3 é uma PsbP de domínio 3, sendo encontrada no lúmen tilacóide. A PsbP pertence a uma família que apresenta como um dos papéis funcionais, a otimização da liberação de oxigênio fotossintético (BRICKER *et al.*, 2013). Estas proteínas são codificadas no núcleo e entram no lúmen do tilacóide pela utilização de ATP. Portanto, a redução da proteína sugere que durante o tratamento  $H_2O_2$ /salino ocorreu alguma regulação na liberação do oxigênio no fotossistema II. A função desta proteína tem sido investigada por alguns autores e parece atuar junto ao PS II na aclimação as condições de estresse.

A frutose 1,6-bifosfato aldolase cloroplástica foi identificada no *spot* 99 mostrando aumento na sua expressão durante esse tratamento. Como já descrito anteriormente, essa enzima está envolvida na assimilação do  $CO_2$  através do ciclo de Calvin e na glicólise cloroplástica. Seus níveis de transcritos parecem aumentar em resposta ao peróxido de hidrogênio em *Codonopsis lanceolata* (PUREV *et al.*, 2008) e para a salinidade em *Sesuvium portulacastrum* (FAN *et al.*, 2009). A tolerância ao sal pode ser devido ao aumento da frutose 1,6-bifosfato aldolase cloroplástica em plantas de tabaco, visto que houve um aumento no



conteúdo de prolina (Zhang *et al.*, 2013). O aumento dessa enzima durante esse tratamento pode ter melhorado a fixação do carbono na fotossíntese, através da manutenção da regeneração da ribulose 1,5-bifosfato.

As EROS são produzidas como subprodutos de vias metabólicas convencionais e sua produção pode ser acelerada, quando ocorre uma variação ambiental. O seu aumento gera danos em diversas biomoléculas. Por conta disso, a célula desenvolveu alguns sistemas de proteção contra EROS. O sistema enzimático contém a ascorbato peroxidase, responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio em água em vários compartimentos celulares. Uma ascorbato peroxidase citosólica foi identificada no *spot* 101, tendo um aumento na sua expressão e indicando, dessa forma, a ativação do sistema antioxidante em busca de se evitar danos provocados pelas EROS. Outra indicação de ativação do sistema antioxidante foi a identificação da glutatona redutase (GR) com expressão aumentada (*spot* 112). Essa enzima faz parte do ciclo ascorbato-glutationa (AsA - GSH) e está envolvida na manutenção da homeostase redox. A GR é uma flavo-proteína oxidorredutase dependente de NADPH. Ela é capaz de converter glutatona oxidada (GSSG) em glutatona reduzida (GSH), portanto ajuda na manutenção da alta proporção de GSH / GSSG sob vários estresses abióticos (TRIVEDI *et al.*, 2013). A GR ajuda na manutenção de GSH e, portanto, a conservação de um ambiente redutor na célula. Tem sido relatado, que a GR desempenha um papel crucial na tolerância a diferentes estresses abióticos. Dessa forma, o aumento dessa proteína nesse tratamento pode ter ajudado a aliviar os danos oxidativos causados pelo estresse salino.

Uma proteína POB1, contendo o domínio BTB/POZ, foi identificada no *spot* 109 revelando uma expressão aumentada. O domínio BTB é um motivo de interação de proteína-proteína, envolvido em diversos processos biológicos (STOGIOS *et al.* 2005). O domínio BTB está envolvido na regulação da expressão gênica, atuando no controle local de conformação da cromatina. O domínio BTB contendo a proteína POB1 foi relacionado com a regulação negativa na defesa contra patógenos e da senescência em *Arabidopsis thaliana* (QU *et al.*, 2010) e *Nicotiana benthamiana* através de vias mediadas por ubiquitina. Assim, sugere-se que o aumento da proteína pode ter ocorrido para proteger a célula contra a senescência.

Os mecanismos plastidiais de desintoxicação de produtos de oxidação de lipídios envolvem enzimas, como a oxidorredutase. Esta proteína está envolvida na redução da ligação dupla de cadeias carbônicas de alcenos ou cetonas, com uma preferência para o carbonil  $\alpha$ ,  $\beta$  - insaturados. Nesse tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino foi identificada no *spot* 104 uma oxidorredutase cloroplástica com expressão diminuída. A diminuição da referida proteína pode sugerir uma modulação no processo de peroxidação durante o tratamento.

Uma chaperonina de 20 kDa cloroplástica (*spot* 113) apresentando expressão aumentada foi também identificada. Essa proteína é uma chaperonina do tipo I, que está envolvida no enovelamento/dobramento e montagem de outras proteínas. No cloroplasto há dois tipos de co-chaperoninas, a Cpn10 e a Cpn20. A Cpn20 é uma forma tetramérica, sendo funcional junto com Cpn60 no redobramento de proteínas desnaturadas no cloroplasto (VIITANEN *et al.*, 1995). Um estudo recente, analisando mutantes de *Arabidopsis* com ausência para Cpn20, revelou que essa proteína não pode ser substituída, tornando a sobrevivência inviável (ZHANG, *et al.*, 2013) (47). Além de sua função tradicional, um estudo com Cpn20 demonstrou que ela pode funcionar ativando uma enzima antioxidante localizada predominantemente no cloroplasto, a Fe-SOD, servindo possivelmente como chaperona (KURO; HUANG; JINN, 2013) O aumento dessa chaperonina durante o tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino, sugere uma resposta da célula relacionada a manutenção da estrutura e atividade de enzimas do cloroplasto, como a Fe-SOD.

Duas transcetolases de cloroplasto foram identificadas nos *spots* 116 e 103 revelando expressões aumentadas. As transcetolases de cloroplasto participam do ciclo de Calvin e da via das pentoses fosfato oxidativa. Durante a fase de regeneração do ciclo de Calvin as transcetolases participam das duas vias. Na via da pentose fosfato oxidativa, a enzima catalisa as mesmas reações, na direção oposta do ciclo de Calvin. O aumento dessa enzima sugere que durante o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/salino, a planta foi capaz de manter a fase regenerativa do ciclo de Calvin, essencial para fotossíntese, bem como manter a produção das pentoses fosfatos que servem para reabastecer outras vias.

### ***7.2.9 Visão geral da resposta do feijão-de-corda, cultivar TVu, ao pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> buscando minimizar os efeitos da salinidade.***

A exposição das plantas de feijão-de-corda ao tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/controle induziu modificações e revelou as principais modulações ocorridas nas proteínas, em resposta ao agente químico. Neste tratamento foram encontradas proteínas associadas à fotossíntese, a defesa redox e ao metabolismo dos carboidratos. A maioria dessas proteínas revelou um aumento nas suas expressões, sugerindo que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi responsável pela ativação de várias vias metabólicas. Particularmente, o tratamento água/salino quando comparado ao tratamento água/controle sugeriu regulação envolvendo um maior número de proteínas relacionadas a diferentes processos metabólicos: fotossíntese, transporte de membrana, defesa/proteção, metabolismo dos lipídios e metabolismo dos carboidratos. A maioria das proteínas relacionadas à fotossíntese tiveram suas expressões diminuídas, prejudicando desta forma a assimilação do CO<sub>2</sub>. Neste tratamento aparentemente ocorreu aumento de EROS levando a peroxidação lipídica e danos

de membrana (Figura 9). Além disso, a presença de uma proteína relacionada à redução dos produtos tóxicos da peroxidação lipídica também indica danos de membrana. Ademais, neste tratamento foram também encontradas duas proteínas antioxidantes com suas expressões aumentadas na tentativa de desintoxicar as EROS.

As proteínas responsivas ao tratamento  $H_2O_2$ / salino forneceram indícios, que o agente químico promoveu melhoria de respostas relacionadas a aclimação das plantas de feijão ao estresse salino. De forma geral, as proteínas estavam associadas à fotossíntese, ao metabolismo dos carboidratos, a defesa/proteção e ao metabolismo dos lipídios. As proteínas relacionadas à fotossíntese tiveram suas expressões reduzidas, essas mesmas proteínas se comportaram de forma semelhante no tratamento água/salino. Desta forma, as modificações provocadas a essas enzimas foram aparentemente devido à salinidade, visto que o tratamento  $H_2O_2$ /controle apresentou um aumento na expressão das proteínas relacionadas a fotossíntese. As proteínas relacionadas ao metabolismo dos carboidratos aumentaram suas expressões, refletindo a necessidade energética requerida para as modulações necessárias para evitar os danos do estresse salino, também foi identificada uma ATP sintase com sua expressão aumentada, o que reforça a ideia de alta demanda energética, gerando ATP para os diversos mecanismos de aclimação ao estresse salino. Ainda nesse tratamento foram encontradas mais proteínas relacionadas a defesa e/ou proteção sugerindo que o pré-tratamento com  $H_2O_2$  pode agir estimulando o sistema de defesa antioxidante e de proteção contra as injúrias provocadas pelo estresse salino. O pré-tratamento com  $H_2O_2$  reduziu a expressão da quinona oxirredutase, uma proteína que atua reduzindo os produtos tóxicos da peroxidação lipídica, enquanto que no tratamento água/salino essa proteína aumentou sua expressão. Portanto, os dados sugerem que o tratamento com  $H_2O_2$  possivelmente foi capaz de atuar na ativação de vias relacionadas com fotossíntese, defesa/proteção e homeostase redox contribuindo para reduzir os efeitos deletérios da salinidade.

## 8 CONCLUSÕES

Os resultados das análises fisiológicas mostraram que o pré-tratamento das plantas de feijão-de-corda (cultivar TVu) por meio da pulverização com peróxido de hidrogênio na concentração de 25 mM atenuou os efeitos da salinidade sobre o crescimento.

As análises bioquímicas revelaram algum envolvimento das enzimas SOD e CAT nos tempos iniciais após a aplicação do peróxido de hidrogênio, o que poderia indicar uma resposta antioxidante. Entretanto, na presença de NaCl, o conteúdo de MDA não foi reduzido devido a pulverização foliar com peróxido de hidrogênio.

Os resultados da análise proteômica sugerem que o pré-tratamento por meio da pulverização com peróxido de hidrogênio ajudou na regulação dos níveis de proteínas envolvidas nos passos iniciais da fotossíntese, como pode ser observado dado o aumento de expressão da Rubisco e da proteína OEE1.

Além disso, ficou demonstrado que o pré-tratamento das plantas de feijão por meio da pulverização com peróxido de hidrogênio associado ao estresse salino foi também capaz de ativar vias de defesa redox envolvendo a glutathione redutase, uma chaperonina cloroplástica, a APX citosólica e POB1 BTB/POZ.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, C. E. B.; ARAÚJO, G. DOS S.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. DE O.; COSTA, J. H.; LEITE, H. DE B.; MORENO, F. B. M. B.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Proteomic analysis of salt stress and recovery in leaves of *Vigna unguiculata* cultivars differing in salt tolerance. **Plant Cell Reports**, Germany, v. 33, n. 8, p. 1289–1306, 26 ago. 2014.
- AGHAEI, K.; EHSANPOUR, A. A.; KOMATSU, S. Proteome Analysis of Potato under Salt Stress. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 7, n. 11, p. 4858–4868, 7 nov. 2008.
- AGARWAL, S.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C.; TYAGI, A.; MEENA, R. C. Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings. **Plant Science**, Amsterdam, v. 169, n. 3, p. 559–570, 2005.
- AGRAWAL, G. K.; JWA, N. S.; IWAHASHI, H.; RAKWAL, R. Importance of ascorbate peroxidases OsAPX1 and OsAPX2 in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling. **Gene**, Amsterdam, v. 322, n. 1-2, p. 93–103, 2003.
- AHMAD, P.; SHARMA, S. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants - a review. **Plant Soil Environ**, Praha, v. 54, p. 89–99, 2008.
- AHMAD, P.; JALEEL, C.; SALEM, M.; NABI, G.; SHARMA, S. Roles of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. **Crit Rev Biotechnol**, England, v. 30, p. 161–175, 2010.
- AHMAD, P.; NABI, G.; ASHRAF, M. Cadmium-induced oxidative damage in mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss.] plants can be alleviated by salicylic acid. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 36–44, 2011.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, England, v. 53, n. 372, p. 1331–1341, 15 maio 2002.
- ANDERSSON, I.; BACKLUND, A. Structure and function of Rubisco. **Plant Physiology and Biochemistry**, France, v. 46, n. 3, p. 275–291, 2008.
- ANDREOU, A.; BRODHUN, F.; FEUSSNER, I. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. **Progress in Lipid Research**, England, v. 48, n. 3-4, p. 148–170, 2009.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual review of plant biology**, USA, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004.
- APSE, M. P.; AHARON, G. S.; SNEDDEN, W. A.; BLUMWALD, E. Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiport in *Arabidopsis*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 285, n. 5431, p. 1256–1258, 1999.
- ARAÚJO, J. P. P.; RIOS, G. P.; WATT, E. E.; NEVES, B. P.; FAGERIA, N. K.; OLIVIERA, I. P.; GUIMARAES, C. M.; SILVIERA FILHO, A. **A cultura do caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp.: descrição e recomendações técnicas de cultivo**. Goiania. EMBRAPA-CNPAP, 1984.

- ASADA, K. Ascorbate peroxidase - A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 85, n. 2, p. 235–241, 1992.
- ASADA, K. THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, USA, v. 50, n. 1, p. 601–639, jun. 1999.
- ASADA, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. **Plant Physiology**, USA, v. 141, n. 2, p. 391–396, 1 jun. 2006.
- ASHFAQUE, F. Exogenously Applied H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Promotes Proline Accumulation, Water Relations, Photosynthetic Efficiency and Growth of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Under Salt Stress. **Annual Research & Review in Biology**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 105–120, 10 jan. 2014.
- ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology Advances**, England, v. 27, n. 1, p. 84–93, 2009.
- ASHRAF, M. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. **Flora**, Brazil, v. 376, p. 361–376, 2004.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 206–216, 2007.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful conditions. **Photosynthetica**, [s.l.], v. 51, p. 163–190, 2013.
- AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; ROLIM MEDEIROS, J.; GOMES-FILHO, E. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 162, n. 10, p. 1114–1122, out. 2005.
- AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENÉAS-FILHO, J.; ABREU, C. E. B. D.; GOMES-FILHO, E. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 87–94, 2006.
- AZEVEDO NETO, A. D.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T. **Salinity and Oxidative Stress**. (A. N. Khan, S. Singh, Eds.) Abiotic stress and plant responses. New Delhi: I. K. International Publishing House, 2008
- BABIYCHUK, E.; KUSHNIR, S.; BELLES-BOIX, E.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamide. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 270, n. 44, p. 26224–26231, 1995.
- BALLMOOS, C.; WIEDENMANN, A.; DIMROTH, P. Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. **Annual Review of Biochemistry**, USA, v. 78, p. 649–672, 2009.
- BHATTACHARJEE, S. An inductive pulse of hydrogen peroxide pretreatment restores redox-homeostasis and oxidative membrane damage under extremes of temperature in two rice cultivars. **Plant Growth Regulation**, [s.l.], v. 68, n. 3, p. 395–410, 26 dez. 2012.

- BANDEHAGH, A.; SALEKDEH, G. H.; TOORCHI, M.; MOHAMMADI, A.; KOMATSU, S. Comparative proteomic analysis of canola leaves under salinity stress. **Proteomics**, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 1965–1975, 2011.
- BARBA-ESPÍN, G.; DIAZ-VIVANCOS, P.; CLEMENTE-MORENO, M. J.; ALBACETE, A.; FAIZE, L.; FAIZE, M.; PÉREZ-ALFOCEA, F.; HERNÁNDEZ, J. A. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. **Plant Cell and Environment**, USA, v. 33, p. 981–994, 2010.
- BASTOS, E. A.; RAMOS, H. M. M.; ANDRADE JÚNIOR, A. S.; NASCIMENTO, F. N.; CARDOSO, M. J. Parâmetros fisiológicos e produtividade de grãos verdes de feijão-caupi sob déficit hídrico. **Water Resources and Irrigation Management**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 31–37, 2012.
- BAUM, J. A.; CHANDLEE, J. M.; SCANDALIOS, J. G. Purification and Partial Characterization of a Genetically Defined Superoxide Dismutase (SOD-1) Associated with Maize Chloroplasts. **Plant Physiology**, USA, v. 73, n. 1, p. 31–35, 1 set. 1983.
- BAXTER, A.; MITTLER, R.; SUZUKI, N. EROS as key players in plant stress signalling. **Journal of Experimental Botany**, England, v. 65, n. 5, p. 1229–1240, 1 mar. 2014.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, USA, v. 44, p. 276–287, 1971.
- BERITOGNOLO, I.; HARFOUCHE, A.; BRILLI, F.; PEROSPERINI, G.; GAUDET, M.; BEROSCHÉ, M.; SALANI, F.; KUZMINSKY, E.; AUVINEN, P.; PAULIN, L.; KANGASJÄRVI, J.; LORETO, F.; VALENTINI, R.; MUGNOZZA, G. S.; SABATTI, M. Comparative study of transcriptional and physiological responses to salinity stress in two contrasting *Populus alba L.* genotypes. **Tree Physiology**, Canada, v. 31, n. 12, p. 1335–1355, 2011.
- BEZERRA, A. C.; ALCÂNTAR NETO, F.; NEVES, A. C. DAS; MAGGIONI, K. Comportamento morfoagronômico de feijão-caupi, cv. BRS Guariba, sob diferentes densidades de plantas. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, PA, v. 55, n. 3, p. 184–189, 2012.
- BIENERT, G. P.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Amsterdam, v. 1758, n. 8, p. 994–1003, ago. 2006.
- BLAIR, I. A. DNA adducts with lipid peroxidation products. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 283, n. 23, p. 15545–15549, 2008.
- BLEE, E. Phytooxylipins and plant defense reactions. **Progress in Lipid Research**, England, v. 37, n. 1, p. 33–72, 1998.
- BLÉEE, E. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. **Trends in Plant Science**, England, v. 7, n. 7, p. 315–321, 2002.
- BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptations to Environmental Stresses. **The Plant Cell**, USA, v. 7, n. 7, p. 1099–1111, 1995.

- BOLWELL, G. P.; DAUDI, A. Reactive Oxygen Species in Plant–Pathogen Interactions. In: DEL RÍO, L. A.; PUPPO, A. (Eds.). **Reactive Oxygen Species in Plant Signaling**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 113–133.
- BONIFÁCIO, A.; MARTINS, M. O.; RIBEIRO, C. W.; FONTENELE, A. V.; CARVALHO, F. E. L.; MARGIS-PINHEIRO, M.; SILVEIRA, J. A. G. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, Denmark, v. 34, n. 10, p. 1705–1722, 2011.
- BRICKER, T. M.; ROOSE, J. L.; ZHANG, P.; FRANKEL, L. K. The PsbP family of proteins. **Photosynthesis Research**, Netherlands, v. 116, n. 2-3, p. 235–250, 2013.
- BOSE, J.; RODRIGO-MORENO, A.; SHABALA, S. EROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, England, v. 65, n. 5, p. 1241–1257, 1 mar. 2014.
- BOWLER, C.; MONTAGU, M. V; INZE, D. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, USA, v. 43, n. 1, p. 83–116, jun. 1992.
- BOWLER, C.; FLUHR, R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends in Plant Science**, England, v. 5, n. 6, p. 241–246, jun. 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, USA, v. 72, p. 248–54, 7 maios 1976.
- BRITO, M. DE M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. DA. Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de <sup>15</sup>N. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 895–905, ago. 2009.
- CAFFARRI, S.; CROCE, R.; CATTIVELLI, L.; BASSI, R. A Look within LHCI: Differential Analysis of the Lhcb1–3 Complexes Building the Major Trimeric Antenna Complex of Higher-Plant Photosynthesis. **Biochemistry**, Washington, v. 43, n. 29, p. 9467–9476, jul. 2004.
- CAMPOS, W. P.; SILVEIRA, M. A.; JOHANN, A. R. G.; WANDER, A. E. Estratégias de Comercialização do Feijão produzido por Agricultores Familiares: Um estudo de caso na Região Leste do Estado de Goiás. **Boletim Conjuntura Econômica Goiana**, 30, 2014.
- CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, , England, v. 163, n. 3, p. 563–571, 2004.
- CAVERZAN, A.; PASSAIA, G.; ROSA, S. B.; RIBEIRO, C. W.; LAZZAROTTO, F.; MARGIS-PINHEIRO, M. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. **Genetics and Molecular Biology**, Brasil, v. 35, n. 4 SUPPL., p. 1011–1019, 2012.



- CAVERZAN, A.; BONIFACIO, A.; CARVALHO, F. E. L.; ANDRADE, C. M. B.; PASSAIA, G.; SCHUNEMANN, M.; MARASCHIN, F. DOS S.; MARTINS, M. O.; TEIXEIRA, F. K.; RAUBER, R.; MARGIS, R.; SILVEIRA, J. A. G.; MARGIS-PINHEIRO, M. The knockdown of chloroplastic ascorbate peroxidases reveals its regulatory role in the photosynthesis and protection under photo-oxidative stress in rice. **Plant Science**, Amsterdam, v. 214, p. 74–87, 2014.
- CHAMPAGNE, A.; BOUTRY, M. Proteomics of nonmodel plant species. **Proteomics**, Amsterdam, v. 13, n. 3-4, p. 663–673, 2013.
- CHAO, Y.-Y.; HSU, Y. T.; KAO, C. H. Involvement of glutathione in heat shock– and hydrogen peroxide–induced cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa L.*) seedlings. **Plant and Soil**, [s.l.], v. 318, n. 1-2, p. 37–45, 8 maio 2009.
- CHATTOPADHYAY, A.; SUBBA, P.; PANDEY, A.; BHUSHAN, D.; KUMAR, R.; DATTA, A.; CHAKRABORTY, S.; CHAKRABORTY, N. Analysis of the grasspea proteome and identification of stress-responsive proteins upon exposure to high salinity, low temperature, and abscisic acid treatment. **Phytochemistry**, England, v. 72, n. 10, p. 1293–1307, 2011.
- CHUTIPAIJIT, S.; CHA-UM, S.; SOMPORNPAILIN, K. High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa L. spp. indica*. **Australian Journal of Crop Science**, [s.l.], v. 5, n. 10, p. 1191–1198, 2011.
- CIRILO, J. A. Políticas públicas de recursos hídricos para o semiárido. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 22, n. 63, p. 61–82, 2008.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, Brasília, v.3 - Safra 2015/16 – Quinto levantamento. Fevereiro de 2016. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 02/05/2016.
- COUTURIER, J.; CHIBANI, K.; JACQUOT, J.-P.; ROUHIER, N. Cysteine–based redox regulation and signaling in plants. **Frontiers in Plant Science**, Switzerland, v. 4, 2013.
- CORPAS, F. J.; FERNANDEZ-OCANA, A.; CARRERAS, A.; VALDERRAMA, R.; LUQUE, F.; ESTEBAN, F. J.; RODRIGUEZ-SERRANO, M.; CHAKI, M.; PEDRAJAS, J. R.; SANDALIO, L. M.; DEL RÍO, L. A.; BAREROSO, J. B. The Expression of Different Superoxide Dismutase Forms is Cell-type Dependent in Olive (*Olea europaea L.*) Leaves. **Plant and Cell Physiology**, Japan, v. 47, n. 7, p. 984–994, 16 maio 2006.
- COSTA, P. H. A.; SILVA, J. V.; BEZERRA, M. A.; ENÉAS FILHO, J.; PRISCO, J. T.; GOMES FILHO, E. Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em cultivares de *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 289–297, 2003.
- COSIO, C.; DUNAND, C. Specific functions of individual class III peroxidase genes. **Journal of Experimental Botany**, England, v. 60, n. 2, p. 391–408, 6 jan. 2009.
- CROCE, R.; VAN AMERONGEN, H. Light-harvesting and structural organization of Photosystem II: From individual complexes to thylakoid membrane. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 104, n. 1–2, p. 142–153, jul. 2011.

CUNHA, R.; CASTRO, M.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteínas – O papel chave da espectrometria de massa na era pós - genômica. **Biotecnologia Ciência e desenvolvimento**, Brasília, v. 36, p. 40–46, 2006.

DANTAS, J.P.; MARINHO, F.J.L.; FERREIRA, M.M.M.; AMORIM, M.S.N.; ANDRADE, S.I.O.; SALES, A.L. Avaliação de genótipos de caupi sob salinidade. **R. Bras. Eng. Agríc. e Amb.**, Campina Grande, v. 6, p. 425–430, 2002.

D'ARCY-LAMETA, A.; FERRARI-ILIOU, R.; CONTOUR-ANSEL, D.; PHAM-THI, A. T.; ZUILY-FODIL, Y. Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in cowpea leaves. **Annals of Botany**, England, v. 97, n. 1, p. 133–140, 2006.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (EROS) and response of antioxidants as EROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, [s.l.], v. 2, 2 dez. 2014.

DASS, C. Introduction to mass spectrometry. In: **Principles and practice of biological mass spectrometry**. Amsterdam: Wiley, 2001.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVÁ, E.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, Switzerland, v. 57, n. 5, p. 779–95, maio 2000.

DE HOOG, C. L.; MANN, M. Proteomics. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, USA, v. 5, p. 267–293, 2004.

DEL RÍO, L. A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M.; BAREROSO, J. B. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in peroxisomes. Production, scavenging and role in cell signalling. **Plant Physiol**, USA, v. 141, p. 330–335, 2006.

DEL RÍO, L. A.; PUPPO, A. (EDS.). **Reactive Oxygen Species in Plant Signaling**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009.

DEL RÍO, L. A. (ED.). **Peroxisomes and their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. v. 69

DEL RÍO, L. A. EROS and RNS in plant physiology: An overview. **Journal of Experimental Botany**, England, v. 66, n. 10, p. 2827–2837, 2015.

DEMIDCHIK, V.; SHABALA, S. N.; DAVIES, J. M. Spatial variation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal Ca<sup>2+</sup> flux and plasma membrane Ca<sup>2+</sup> channels. **The Plant Journal**, Inglaterra, England, v. 49, n. 3, p. 377–386, 8 jan. 2007.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 109, p. 212–228, 2015.

DENNIS, D.; BLAKELEY, S. **Carbohydrate metabolism**. (B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds.) Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000

- DESINGH, R.; KANAGARAJ, G. Influence of salinity stress on photosynthesis and antioxidative systems in two cotton varieties. **Gen. Appl. Plant Physiol**, [s.l.], v. 33, n. 3-4, p. 221–234, 2007.
- DESIKAN, R. Regulation of the *Arabidopsis* Transcriptome by Oxidative Stress. **Plant Physiology**, USA, v. 127, n. 1, p. 159–172, 1 set. 2001.
- DIETZ, K. J.; TAVAKOLI, N.; KLUGE, C.; MIMURA, T.; SHARMA, S. S.; HARRIS, G. C.; CHARDONNENS, A N.; GOLLDACK, D. Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. **Journal of experimental botany**, England, v. 52, n. 363, p. 1969–1980, 2001.
- DIXON, R.; PAIVA, N. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. **The Plant Cell**, USA, v. 7, n. 7, p. 1085–1097, 1995.
- DU, C.-X.; FAN, H.-F.; GUO, S.-R.; TEZUKA, T.; LI, J. Proteomic analysis of cucumber seedling roots subjected to salt stress. **Phytochemistry**, England, v. 71, n. 13, p. 1450–1459, set. 2010.
- ELKAHOUI, S.; SMAOUI, A.; ZARROUK, M.; GHRIR, R.; LIMAM, F. Salt-induced lipid changes in *Catharanthus roseus* cultured cell suspensions. **Phytochemistry**, England, v. 65, n. 13, p. 1911–1917, 2004.
- ESAKA, M.; YAMADA, N.; KITABAYASHI, M.; SETOGUCHI, Y.; TSUGEKI, R.; KONDO, M.; NISHIMURA, M. cDNA cloning and differential gene expression of three catalases in pumpkin. **Plant Molecular Biology**, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 141–155, 1997.
- ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde, and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, Amsterdam, v. 11, p. 81–128, 1991.
- FAN, W.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y. Cloning and molecular characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene regulated by high-salinity and drought in *Sesuvium portulacastrum*. **Plant Cell Reports**, Germany, v. 28, n. 6, p. 975–984, 19 jun. 2009.
- FAO 2013. Production, Crops. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acesso em 01/07/2016.
- FARMER, E. E.; DAVOINE, C. Reactive electrophile species. **Current Opinion in Plant Biology**, England, v. 10, n. 4, p. 380–386, 2007.
- FEDINA, I. S.; NEDEVA, D.; ÇIÇEK, N. Pre-treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces salt tolerance in Barley seedlings. **Biologia Plantarum**, [s.l.], v. 53, n. 2, p. 321–324, 4 jun. 2009.
- FLOWERS, T. J.; TROKE, P. F.; YEO, A R. The Mechanism of Salt Tolerance in Halophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 89–121, 1977.
- FOOLAD, M. R.; SUBBIAH, P.; KRAMER, C.; HARGRAVE, G.; LIN, G. Y. Genetic relationships among cold, salt and drought tolerance during seed germination in an interspecific cross of tomato. **Euphytica**, [s.l.], v. 130, n. 2, p. 199–206, 2003.

FOREMAN, J.; DEMIDCHIK, V.; BOTHWELL, J. H. F.; MYLONA, P.; MIEDEMA, H.; TORRES, M. A.; LINSTAD, P.; COSTA, S.; BROWNLEE, C.; JONES, J. D. G.; DAVIES, J. M.; DOLAN, L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, England, v. 422, n. 6930, p. 442–446, 27 mar. 2003.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signalling. **New Phytologist**, England, v. 146, n. 3, p. 359–388, 2000.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 119, n. 3, p. 355–364, 2003.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. **The Plant Cell**, USA, v. 17, n. 7, p. 1866–1875, 1 jul. 2005.

FREIRE FILHO, F. R. **Genética do caupi**. (J. P. P. de ARAÚJO, E. E. WATT, Eds.) O caupi no Brasil. Brasília. ITA/EMBRAPA, 1988

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. DOS. **Melhoramento genético**. (F. R. FREIRE FILHO, J. A. de A. LIMA, V. Q. RIBEIRO, Eds.) Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005

FROTA, K. DE M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 470–476, 2008.

FROTA, K. M. G.; MENDONÇA, S.; SALDIVA, P. H. N.; CRUZ, R. J.; ARÊAS, J. A. G. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. **Journal of Food Science**, USA, v. 73, n. 9, 2009.

FRUGOLI, J. A.; ZHONG, H. H.; NUCCIO, M. L.; MCCOURT, P.; MCPEEK, M. A.; THOMAS, T. L.; MCCLUNG, C. R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. [s.l], v. 112, n. 1, p. 327–336, 1996.

GAPPER, C.; DOLAN, L. Control of plant development by reactive oxygen species. **Plant Physiol**, USA, v. 141, p. 341–345, 2006.

GARG, N.; MANCHANDA, G. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s.l], v. 30, n. 5, p. 595–618, 2008.

GEISZT, M.; LETO, T. L. The Nox family of NAD(P)H oxidases: Host defense and beyond. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 279, n. 50, p. 51715–51718, 2004.

GIANNOPOLITIS, C.; RIES, S. Superoxide dismutases II. purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. **Plant Physiology**, USA, v. 59, p. 315–318, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, France, v. 48, n. 12, p. 909–930, dez. 2010.

- GOGILE, A.; ANDARGIE, M.; MUTHUSWAMY, M. Screening selected genotypes of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] for salt tolerance during seedling growth stage. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, [s.l.], v. 16, n. 14, p. 671–679, 2013.
- GONDIM, F. A.; GOMES-FILHO, E.; COSTA, J. H.; ALENCAR, N. L. M.; PRISCO, J. T. Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize. **Plant Physiology and Biochemistry**, France, v. 56, p. 62–71, jul. 2012.
- GONG, M.; CHEN, B. O.; LI, Z.-G.; GUO, L.-H. Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 158, n. 9, p. 1125–1130, jan. 2001.
- GONZALEZ, A.; CABRERA, M. D. L. A.; HENRIQUEZ, M. J.; CONTRERAS, R. A.; MORALES, B.; MOENNE, A. Cross Talk among Calcium, Hydrogen Peroxide, and Nitric Oxide and Activation of Gene Expression Involving Calmodulins and Calcium-Dependent Protein Kinases in *Ulva compressa* Exposed to Copper Excess. **Plant Physiology**, USA, v. 158, n. 3, p. 1451–1462, 1 mar. 2012.
- GRAHL, S.; REITER, B.; GÜGEL, I. L.; VAMVAKA, E.; GANDINI, C.; JAHNS, P.; SOLL, J.; LEISTER, D.; RÜHLE, T. The Arabidopsis Protein CGLD11 Is Required for Chloroplast ATP Synthase Accumulation. **Molecular Plant**, [s.l.], v. 9, n. 6, p. 885–899, 2016.
- GRANLUND, I.; STORM, P.; SCHUBERT, M.; GARCÍA-CERÁDN, J. G.; FUNK, C.; SCHRÖDER, W. P. The TL29 protein is lumen located, associated with psii and not an ascorbate peroxidase. **Plant and Cell Physiology**, Japan, v. 50, n. 11, p. 1898–1910, 2009.
- GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, USA, v. 66, n. 1, p. 39–63, 2002.
- GUAZELLI, J. R. **Histórico das pesquisas com caupi no Brasil**. (J. P. P. Araujo, E. E. WATT, Eds.) O caupi no Brasil. Brasília, DF: EMBRAPA-CNPAF, 1988
- GUAN, L.; SCANDALIOS, J. G. Molecular evolution of maize catalases and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic catalases. **Journal of Molecular Evolution**, [s.l.], v. 42, n. 5, p. 570–579, 1996.
- GUAN, Q.; WANG, Z.; WANG, X.; TAKANO, T.; LIU, S. A peroxisomal APX from *Puccinellia tenuiflora* improves the abiotic stress tolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana* through decreasing of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation. **Journal of plant physiology**, Germany, v. 175, p. 183–91, 1 mar. 2015.
- GUPTA, K.; DEY, A.; GUPTA, B. Plant polyamines in abiotic stress responses. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s.l.], v. 35, n. 7, p. 2015–2036, 2 jul. 2013.
- HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, USA, v. 141, n. 2, p. 312–322, 1 jun. 2006.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals In Biology and Medicine**. 4. ed. USA: Oxford University Press, 2007.

- HAN, S.; FANG, L.; REN, X.; WANG, W.; JIANG, J. MPK6 controls H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced root elongation by mediating Ca<sup>2+</sup> influx across the plasma membrane of root cells in *Arabidopsis* seedlings. **New Phytologist**, England, v. 205, n. 2, p. 695–706, jan. 2015.
- HARDIN, S. C.; LARUE, C. T.; OH, M.-H.; JAIN, V.; HUBER, S. C. Coupling oxidative signals to protein phosphorylation via methionine oxidation in *Arabidopsis*. **Biochemical Journal**, Inglaterra, England, v. 422, n. 2, p. 305–312, 1 set. 2009.
- HASAN, S. A.; IRFAN, M.; MASRAHI, Y. S.; KHALAF, M. A.; HAYAT, S.; TEJADA MORAL, M. Growth, photosynthesis, and antioxidant responses of *Vigna unguiculata* L. treated with hydrogen peroxide. **Cogent Food & Agriculture**, [s.l], v. 2, n. 1, p. 1155331, 31 dez. 2016.
- HASEGAWA, M.; BRESSAN, R.; ZHU, J.-K.; BHONERT, H. Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. **Annu. Rev. Plant Physiol**, USA, v. 51, p. 493–499, 2000.
- HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant physiology**, USA, v. 84, n. 2, p. 450–455, 1987.
- HEATH, R.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, USA, v. 125, p. 189–198, 1968.
- HERNÁNDEZ, J. A.; FERRER, M. A.; JIMÉNEZ, A.; BARCELÓ, A. R.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiology**, USA, v. 127, p. 817–831, 2001.
- HERNANDEZ, J. A.; ALMANSA, M. S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 115, p. 251–257, 2002.
- HERNÁNDEZ-BARRERA, A.; VELARDE-BUENDÍA, A.; ZEPEDA, I.; SANCHEZ, F.; QUINTO, C.; SÁNCHEZ-LOPEZ, R.; CHEUNG, A.; WU, H.-M.; CARDENAS, L. Hyper, a Hydrogen Peroxide Sensor, Indicates the Sensitivity of the *Arabidopsis* Root Elongation Zone to Aluminum Treatment. **Sensors**, Switzerland, v. 15, n. 1, p. 855–867, 6 jan. 2015.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, [s.l], 347, p. 1-32, 1950.
- HOQUE, M. A.; BANU, M. N. A.; OKUMA, E.; AMAKO, K.; NAKAMURA, Y.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 164, n. 11, p. 1457–1468, 2007.
- HOSSAIN, M. A.; MUNEMASA, S.; URAJI, M.; NAKAMURA, Y.; MORI, I. C.; MURATA, Y. Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, USA, v. 156, n. 1, p. 430–8, 2011.
- HOSSAIN, M.; FUJITA, M. Hydrogen Peroxide Priming Stimulates Drought Tolerance in Mustard (*Brassica juncea* L.) Seedlings. **Plant Gene and Trait**, [s.l], v. 4, p. 109–123, 2013.

HOSSAIN, M. A.; BHATTACHARJEE, S.; ARMIN, S.-M.; QIAN, P.; XIN, W.; LI, H.-Y.; BURRITT, D. J.; FUJITA, M.; TRAN, L.-S. P. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from EROS detoxification and scavenging. **Frontiers in Plant Science**, Switzerland, v. 6, 16 jun. 2015.

HU, Q.; NOLL, R. J.; LI, H.; MAKAROV, A.; HARDMAN, M.; COOKS, R. G. The Orbitrap: A new mass spectrometer. **Journal of Mass Spectrometry**, England, v. 40, n. 4, p. 430–443, 2005.

HU, H.; DAI, M.; YAO, J.; XIAO, B.; LI, X.; ZHANG, Q.; XIONG, L. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 35, p. 12987–92, 2006.

ISHIBASHI, Y.; YAMAGUCHI, H.; YUASA, T.; IWAYA-INOUE, M.; ARIMA, S.; ZHENG, S.-H. Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 168, n. 13, p. 1562–1567, set. 2011.

ISHIDA MAKINO A., MAE T., H. Fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by reactive oxygen species occurs near Gly-329. **The J. Biological Chemistry**, [s.l], v. 274, n. 8, p. 5222–5226, 1999.

IWAMOTO, M.; HIGO, H.; HIGO, K. Differential diurnal expression of rice catalase genes: the 5'-flanking region of CatA is not sufficient for circadian control. **Plant Science**, Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 39–46, fev. 2000.

JAMIL, A.; RIAZ, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Gene Expression Profiling of Plants under Salt Stress. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s.l], v. 30, n. December, p. 435–458, 2011.

JANSSON, S. The Light-Harvesting Chlorophyll a/B Binding-Proteins. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1184, n. 1, p. 1–19, 1994.

JANSSON, S. A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, England, v. 4, n. 6, p. 236–240, 1999.

JESPERSEN, H. M.; KJAERSGÅRD, I. V.; OSTERGAARD, L.; WELINDER, K. G. From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. **The Biochemical journal**, England, v. 326, p. 305–310, 1997.

JI, W.; CONG, R.; LI, S.; LI, R.; QIN, Z.; LI, Y.; ZHOU, X.; CHEN, S.; LI, J. Comparative Proteomic Analysis of Soybean Leaves and Roots by iTRAQ Provides Insights into Response Mechanisms to Short-Term Salt Stress. **Frontiers in Plant Science**, Switzerland, v. 7, n. April, p. 1–15, 2016.

JISHA, K.; VIJAYAKUMARI, K.; PUTHUR, J. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s.l], 2013.

JITHESH, M. N.; PRASHANTH, S. R.; SIVAPRAKASH, K. R.; PARIDA, A. Monitoring expression profiles of antioxidant genes to salinity, iron, oxidative, light and hyperosmotic

stresses in the highly salt tolerant grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. by mRNA analysis. **Plant cell reports**, Germany, v. 25, n. 8, p. 865–76, ago. 2006.

JOB, C.; RAJJOU, L.; LOVIGNY, Y.; BELGHAZI, M.; JOB, D. Patterns of Protein Oxidation in Arabidopsis Seeds and during Germination. **Plant Physiology**, USA, v. 138, n. 2, p. 790–802, 2005.

JOHANSSON, E.; OLSSON, O.; NYSTROM, T. Progression and Specificity of Protein Oxidation in the Life Cycle of Arabidopsis thaliana. **The Journal Of Biological Chemistry**, USA, v. 279, n. 21, p. 22204–22208, 2004.

JORRÍN-NOVO, J. V.; MALDONADO, A. M.; ECHEVARRÍA-ZOMEÑO, S.; VALLEDOR, L.; CASTILLEJO, M. A.; CURTO, M.; VALERO, J.; SGHAIER, B.; DONOSO, G.; REDONDO, I. Plant proteomics update (2007-2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 72, n. 3, p. 285–314, 2009.

JUBANY-MARÍ, T.; MUNNÉ-BOSCH, S.; LÓPEZ-CARBONELL, M.; ALEGRE, L. Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L., to summer drought. **Journal of Experimental Botany**, England, v. 60, n. 1, p. 107–120, 2009.

KAO, C. H. Role of Hydrogen Peroxide in Rice Plants. **Crop Environ Bioinform**, [s.l], v. 11, p. 1–10, 2014.

KAPRAVELOU, G.; MARTÍNEZ, R.; ANDRADE, A. M.; LÓPEZ CHAVES, C.; LÓPEZ-JURADO, M.; ARANDA, P.; ARREBOLA, F.; CAÑIZARES, F. J.; GALISTEO, M.; PORRES, J. M. Improvement of the antioxidant and hypolipidaemic effects of cowpea flours (*Vigna unguiculata*) by fermentation: results of in vitro and in vivo experiments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s.l], v. 95, n. 6, p. 1207–1216, 2015.

KARPINSKI, S.; GABRYS, H.; MATEO, A.; KARPINSKA, B.; MULLINEAUX, P. M. Light perception in plant disease defence signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, Inglaterra, England, v. 6, n. 4, p. 390–396, 2003.

KAUR, N.; DHAWAN, M.; SHARMA, I.; PATI, P. K. Interdependency of Reactive Oxygen Species generating and scavenging system in salt sensitive and salt tolerant cultivars of rice. **BMC Plant Biology**, [s.l], v. 16, n. 1, p. 131, 2016.

KEREPESI, I.; GALIBA, G. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. **Crop Science**, [s.l], v. 40, n. 2, p. 482–487, 2000.

KHAN, M. A.; UNGAR, I. A.; SHOWALTER, A. M. Effects of sodium chloride treatments on growth and ion accumulation of the halophyte *Haloxylon recurvum*. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, [s.l], v. 31, n. 17-18, p. 2763–2774, 2000.

KIM, D. W.; RAKWAL, R.; AGRAWAL, G. K.; JUNG, Y. H.; SHIBATO, J.; JWA, N. S.; IWAHASHI, Y.; IWAHASHI, H.; KIM, D. H.; SHIM, I. S.; USUI, K. A hydroponic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf. **Electrophoresis**, Germany, v. 26, n. 23, p. 4521–4539, 2005.



- KIM, E. H.; LI, X. P.; RAZEGHIFARD, R.; ANDERSON, J. M.; NIYOGI, K. K.; POGSON, B. J.; CHOW, W. S. The multiple roles of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes define structure and optimize function of *Arabidopsis* chloroplasts: A study using two chlorophyll b-less mutants. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1787, n. 8, p. 973–984, 2009.
- KIM, S. G.; KIM, S. T.; WANG, Y.; KIM, S. K.; LEE, C. H.; KIM, K. K.; KIM, J. K.; LEE, S. Y.; KANG, K. Y. Overexpression of rice isoflavone reductase-like gene (OsIRL) confers tolerance to reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 138, n. 1, p. 1–9, 2010.
- KIM, Y.; TSUDA, K.; IGARASHI, D.; HILLMER, R. A.; SAKAKIBARA, H.; MYERS, C. L.; KATAGIRI, F. Mechanisms underlying robustness and tunability in a plant immune signaling network. **Cell Host Microbe**, United States, v. 15, n. 1, p. 84–94, 2014.
- KITAJIMA, S. Hydrogen peroxide-mediated inactivation of two chloroplastic peroxidases, ascorbate peroxidase and 2-Cys peroxiredoxin. **Photochemistry and Photobiology**, [s.l.], v. 84, n. 6, p. 1404–1409, 2008.
- KONIECZNY, R.; BANAS, A. K.; SUROWKA, E.; MICHALEC, Z.; MISZALSKI, Z.; LIBIK-KONIECZNY, M. Pattern of antioxidant enzyme activities and hydrogen peroxide content during developmental stages of rhizogenesis from hypocotyl explants of *Mesembryanthemum crystallinum* L. **Plant Cell Reports**, Germany, v. 33, n. 1, p. 165–177, 2014.
- KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I. T.; RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 8, p. 1301–1322, ago. 2011.
- KRIEGER-LISZKAY, A. Singlet oxygen production in photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, England, v. 56, n. 411, p. 337–346, 2004.
- KRUGER, N. J.; VON SCHAEWEN, A. The oxidative pentose phosphate pathway: Structure and organisation. **Current Opinion in Plant Biology**, England, v. 6, n. 3, p. 236–246, 2003.
- KUO, W.-Y.; HUANG, C.-H.; JINN, T.-L. Chaperonin 20 might be an iron chaperone for superoxide dismutase in activating iron superoxide dismutase (FeSOD). **Plant Signaling & Behavior**, USA, v. 8, n. 2, p. e23074, fev. 2013.
- KWIATOWSKI, J.; KANIUGA, Z. Isolation and characterization of cytosolic and chloroplast isoenzymes of Cu,Zn-superoxide dismutase from tomato leaves and their relationships to other Cu,Zn-superoxide dismutases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular**, [s.l.], v. 874, n. 1, p. 99–115, 1986.
- LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, England, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LANG, T.; SUN, H.; LI, N.; LU, Y.; SHEN, Z.; JING, X.; XIANG, M.; SHEN, X.; CHEN, S. Multiple signaling networks of extracellular ATP, hydrogen peroxide, calcium, and nitric oxide in the mediation of root ion fluxes in secretor and non-secretor mangroves under salt stress. **Aquatic Botany**, [s.l.], v. 119, p. 33–43, out. 2014.

LÄUCHLI, A.; GRATAN, S. R. Plant Growth and Development Under Salinity Stress. (M. Jenks, P. Hasegawa, S. Jain, Eds.) **Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops and Salt Tolerant Crops**. New York: Springer-Verlag, 2007

LEONARDUZZI, G.; ARKAN, M. C.; BASAGA, H.; CHIARPOTTO, E.; SEVANI, A.; POLI, G. Lipid Oxidation Products in Cell Signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, [s.l], v. 28, n. 9, p. 1370–1378, 2000.

LI, J.-T.; QIU, Z.-B.; ZHANG, X.-W.; WANG, L.-S. Exogenous hydrogen peroxide can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s.l], v. 33, n. 3, p. 835–842, 21 maio 2011.

LI, W.; ZHAO, F.; FANG, W.; XIE, D.; HOU, J.; YANG, X.; ZHAO, Y.; TANG, Z.; NIE, L.; LV, S. Identification of early salt stress responsive proteins in seedling roots of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) employing iTRAQ-based proteomic technique. **Frontiers in Plant Science**, Switzerland, v. 6, 11 set. 2015.

LIAO, W.; XIAO, H.; ZHANG, M. Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in adventitious root development of marigold. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s.l], v. 31, n. 6, p. 1279–1289, 2009.

LINDAHL, M.; MATA-CABANA, A.; KIESELBACH, T. The disulfide proteome and other reactive cysteine proteomes: analysis and functional significance. **Antioxidants & Redox Signaling**, USA, v. 14, n. 12, p. 2581–642, 15 jun. 2011.

LIU, C.-W.; CHANG, T.-S.; HSU, Y.-K.; WANG, A. Z.; YEN, H.-C.; WU, Y.-P.; WANG, C.-S.; LAI, C.-C. Comparative proteomic analysis of early salt stress responsive proteins in roots and leaves of rice. **Proteomics**, Amsterdam, v. 14, n. 15, p. 1759–1775, ago. 2014.

LIU, H.; WANG, C.; CHEN, F.; SHEN, S. Proteomic analysis of oil bodies in mature *Jatropha curcas* seeds with different lipid content. **Journal of proteomics**, Amsterdam, v. 113, p. 403–414, 15 jan. 2015.

LIU, S.; DONG, Y. J.; XU, L. L.; KONG, J.; BAI, X. Y. Roles of exogenous nitric oxide in regulating ionic equilibrium and moderating oxidative stress in cotton seedlings during salt stress. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, [s.l], v. 13, p. 929–941, 2013.

LIU, Z.; YAN, H.; WANG, K.; KUANG, T.; ZHANG, J.; GUI, L.; AN, X.; CHANG, W. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. **Nature**, England, v. 428, n. 6980, p. 287–292, 18 mar. 2004.

LU, Y.; LI, N.; SUN, J.; HOU, P.; JING, X.; ZHU, H.; DENG, S.; HAN, Y.; HUANG, X.; MA, X.; ZHAO, N.; ZHANG, Y.; SHEN, X.; CHEN, S. Exogenous hydrogen peroxide, nitric oxide and calcium mediate root ion fluxes in two non-secretor mangrove species subjected to NaCl stress. **Tree Physiology**, Canada, v. 33, n. 1, p. 81–95, 2013.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 224, p. 164–175, dez. 2015.

MA, H.; SONG, L.; HUANG, Z.; YANG, Y.; WANG, S.; WANG, Z.; TONG, J.; GU, W.; MA, H.; XIAO, L. Comparative proteomic analysis reveals molecular mechanism of seedling

roots of different salt tolerant soybean genotypes in responses to salinity stress. **EuPA Open Proteomics**, Amsterdam, v. 4, p. 40–57, set. 2014.

MA, H.; SONG, L.; SHU, Y.; WANG, S.; NIU, J.; WANG, Z.; YU, T.; GU, W.; MA, H. Comparative proteomic analysis of seedling leaves of different salt tolerant soybean genotypes. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 5, p. 1529–1546, fev. 2012.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of biochemistry and biophysics**, USA, v. 444, n. 2, p. 139–58, 2005.

MALOLEPSZA, U.; ROZALSKA, S. Nitric oxide and hydrogen peroxide in tomato resistance: Nitric oxide modulates hydrogen peroxide level in o-hydroxyethylrutin-induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, France, v. 43, n. 6, p. 623–635, 2005.

MANN, M.; HENDRICKSON, R. C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, USA, v. 70, p. 437–73, 2001.

MAO, J.; CHI, W.; OUYANG, M.; HE, B.; CHEN, F.; ZHANG, L. PAB is an assembly chaperone that functions downstream of chaperonin 60 in the assembly of chloroplast ATP synthase coupling factor 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington p. 201413392, 2015.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio - Brasil 2014/15 a 2024/2025. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 10/06/2016.

MARUTA, T.; NOSHI, M.; TANOUCHI, A.; TAMOI, M.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K.; ISHIKAWA, T.; SHIGEOKA, S. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-triggered Retrograde Signaling from Chloroplasts to Nucleus Plays Specific Role in Response to Stress. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 287, n. 15, p. 11717–11729, 6 abr. 2012.

MAXWELL, D. P.; WANG, Y.; MCINTOSH, L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 14, p. 8271–8276, 6 jul. 1999.

MAZARS, C.; BOURQUE, S.; MITHÖFER, A.; PUGIN, A.; RANJEVA, R. Calcium homeostasis in plant cell nuclei. **New Phytologist**, England, v. 181, n. 2, p. 261–274, jan. 2009.

MCCUBREY, J. A.; LAHAIR, M. M.; FRANKLIN, R. A. Reactive Oxygen Species-Induced Activation of the MAP Kinase Signaling Pathways. **Antioxidants & Redox Signaling**, USA, v. 8, n. 9-10, p. 1775–1789, set. 2006.

MCKERSIE, B. D.; BOWLEY, S. R.; JONES, K. S. Winter Survival of Transgenic Alfalfa Overexpressing Superoxide Dismutase1. **Plant Physiology**, USA, v. 119, n. 3, p. 839–848, 1999.

MILLER, G. Could Heat Shock Transcription Factors Function as Hydrogen Peroxide Sensors in Plants? **Annals of Botany**, England, v. 98, n. 2, p. 279–288, 21 jun. 2006.

MILLER, G.; SCHLAUCH, K.; TAM, R.; CORTES, D.; TORRES, M. A.; SHULAEV, V.; DANGL, J. L.; MITTLER, R. The Plant NADPH Oxidase RBOHD Mediates Rapid Systemic Signaling in Response to Diverse Stimuli. **Science Signaling**, Washington, v. 2, n. 84, p. ra45-ra45, 18 ago. 2009.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment**, USA, v. 33, n. 4, p. 453–467, abr. 2010.

MELONI, D. A.; OLIVA, M. A.; MARTINEZ, C. A.; CAMBRAIA, J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 69–76, 2003.

MITTOVA, V.; TAL, M.; VOLOKITA, M.; GUY, M. Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 115, p. 393–400, 2002.

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

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, England, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002.

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

MITTLER, R.; BLUMWALD, E. Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives. **Annual Review of Plant Biology**, USA, v. 61, n. 1, p. 443–462, 2 jun. 2010.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. EROS signaling: the new wave? **Trends in Plant Science**, England, v. 16, n. 6, p. 300–309, jun. 2011.

MOHAMED, H. E.; HEMEIDA, A. E.; GABER MOHAMED, A. Role Of Hydrogen Peroxide Pretreatment On Developing Antioxidant Capacity In The Leaves Of Tomato Plant (*Lycopersicon Esculentum*) Grown Under Saline Stress. **International Journal of Advanced Research Journal**, [s.l], v. 3, n. 2, p. 878–879, 2015.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual review of plant biology**, USA, v. 58, p. 459–81, 2007.

MORAN, J. F.; JAMES, E. K.; RUBIO, M. C.; SARATH, G.; KLUCAS, R. V.; BECANA, M. Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules. **Plant Physiology**, USA, v. 133, n. 21, p. 773–782, 2003.

- MÜHLING, K. H.; LÄUCHLI, A. Effect of salt stress on growth and cation compartmentation in leaves of two plant species differing in salt tolerance. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 159, n. 2, p. 137–146, 2002.
- MUELLER, M. J.; BERGER, S. Reactive electrophilic oxylipins: Pattern recognition and signalling. **Phytochemistry**, England, v. 70, n. 13-14, p. 1511–1521, 2009.
- MULLER, P.; LI, X.; NIYOGI, K. Non-Photochemical quenching. A response to excess Light energy. **Plant Physiology**, USA, v. 125, n. 4, p. 1558–1566, 1 abr. 2001.
- MULLINEAUX, P. M.; BAKER, N. R. Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death? **Plant physiology**, USA, v. 154, n. 2, p. 521–525, 2010.
- MUNNS, R.; TERMAAT, A. Whole-plant responses to salinity. **Australian Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 13, n. 1977, p. 143–160, 1986.
- MUNNS, R. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. **Plant, Cell & Environment**, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 15–24, 1993.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant Cell, & Environment**, [s.l.], v. 25, p. 239–250, 2002.
- MUNNS, R. Genes and salt tolerance: Bringing them together. **New Phytologist**, England, v. 167, n. 3, p. 645–663, 2005.
- MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual review of plant biology**, USA, v. 59, p. 651–81, 2008.
- MYLONA, P.; POLIDOEROS, A. EROS Regulation of Antioxidant Genes. In: **Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants**. [s.l.] Science Publishers, 2010. p. 101–127.
- MYOUGA, F.; HOSODA, C.; UMEZAWA, T.; IIZUMI, H.; KUROMORI, T.; MOTOHASHI, R.; SHONO, Y.; NAGATA, N.; IKEUCHI, M.; SHINOZAKI, K. A Heterocomplex of Iron Superoxide Dismutases Defends Chloroplast Nucleoids against Oxidative Stress and Is Essential for Chloroplast Development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell Online**, USA, v. 20, n. 11, p. 3148–3162, 25 nov. 2008.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol.**, [s.l.], v. 22, p. 867–880, 1981.
- NEILL, S. J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, England, v. 5, p. 388–395, 2002.
- NETONDO, G. W.; ONYANGO, J. C.; BECK, E. Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. **Crop Science**, [s.l.], v. 44, n. 3, p. 806–811, 2004.
- NG, N. Q.; MARECHAL, R. **Cowpea taxonomy, origin germ plasm**. (S. R. SINCH, K. O. RACHIE, Eds.) Cowpea research, production and utilization. Chichester: John Wiley, 1985

- NGARA, R.; NDIMBA, B. K. Understanding the complex nature of salinity and drought-stress response in cereals using proteomics technologies. **Proteomics**, Amsterdam, v. 14, n. 4-5, p. 611–621, mar. 2014.
- NGUYEN, G. N.; HAILSTONES, D. L.; WILKES, M.; SUTTON, B. G. Drought-induced oxidative conditions in rice anthers leading to a programmed cell death and pollen abortion. **Journal of Agronomy and Crop Science**, [s.l], v. 195, n. 3, p. 157–164, 2009.
- NIU, L.; LIAO, W. Hydrogen Peroxide Signaling in Plant Development and Abiotic Responses: Crosstalk with Nitric Oxide and Calcium. **Frontiers in Plant Science**, Switzerland, v. 7, 4 mar. 2016.
- NOCTOR, G.; VELJOVIC-JOVANOVIC, S.; DRISCOLL, S.; NOVITSKAYA, L.; FOYER, C. H. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: A predominant role for photorespiration? **Annals of Botany**, England, v. 89, n. SPEC. ISS., p. 841–850, 2002.
- NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; FOYER, C. H. The Roles of Reactive Oxygen Metabolism in Drought: Not So Cut and Dried. **Plant Physiology**, USA, v. 164, n. 4, p. 1636–1648, 1 abr. 2014.
- NOUNJAN, N.; NGHIA, P. T.; THEERAKULPISUT, P. Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 169, n. 6, p. 596–604, 2012.
- O'BRIEN, J. A. O.; DAUDI, A.; BUTT, V. S.; BOLWELL, G. P. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. **Planta**, Germany, v. 236, n. 3, p. 765–779, 2012.
- OLIVEIRA, F. DE A. DE; MEDEIROS, J. F. DE; ALVES, R. DE C.; LIMA, L. A.; SANTOS, S. T. DOS; RÉGIS, L. R. DE L. Produção de feijão caupi em função da salinidade e regulador de crescimento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 19, n. 11, p. 1049–1056, 2015.
- ONG, S.-E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature Chemical Biology**, England, v. 1, n. 5, p. 252–62, 2005.
- ORABI, S. A.; DAWOOD, M. G.; SALMAN, S. R. Comparative study between the physiological role of hydrogen peroxide and salicylic acid in alleviating the harmful effect of low temperature on tomato plants grown under sand-ponic culture. **Scientia Agriculturae**, [s.l], v. 9, n. 1, 2015.
- OROZCO-CÁRDENAS, M. L.; NARVÁEZ-VÁSQUEZ, J.; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. **The Plant Cell**, USA, v. 13, n. 1, p. 179–91, jan. 2001.
- OTOCH, M. DE L. O.; MENEZES SOBREIRA, A. C.; FARIS DE ARAGÃO, M. E.; ORELLANO, E. G.; SILVA LIMA, M. DA G.; FERNANDES DE MELO, D. Salt modulation of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase activities in *Vigna unguiculata*. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 158, n. 5, p. 545–551, 2001.

- PADULOSI, S.; NG, Q. N.; PADULOSIL, S.; NG, N. Q. **Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp.** (B. . B. SINGH, R. MOHAN, K. E. DASHIELL, L. E. N. JACKAI, Eds.) *Advances in Cowpea Research*. Tsukuba: IITA JIRCAS, 1997
- PÁL, M.; SZALAI, G.; JANDA, T. Speculation: Polyamines are important in abiotic stress signaling. **Plant Science**, Amsterdam, v. 237, p. 16–23, ago. 2015.
- PAN, J.; ZHANG, M.; KONG, X.; XING, X.; LIU, Y.; ZHOU, Y.; LIU, Y.; SUN, L.; LI, D. ZmMPK17, a novel maize group D MAP kinase gene, is involved in multiple stress responses. **Planta**, Germany, v. 235, n. 4, p. 661–676, 18 abr. 2012.
- PAN, Y.; WU, L. J.; YU, Z. L. Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). **Plant Growth Regulation**, [s.l], v. 49, n. 2-3, p. 157–165, 20 nov. 2006.
- PANCHUK, I. I.; ZENTGRAF, U.; VOLKOV, R. A. Expression of the APX gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Germany, v. 222, n. 5, p. 926–932, 2005.
- PANDEY, A; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, England, v. 405, n. 6788, p. 837–846, 2000.
- PANG, C.; WANG, B. Oxidative Stress and Salt Tolerance in Plants. **Progress in Botany**, [s.l], v. 69, p. 231–245, 2008.
- PANG, Q.; CHEN, S.; DAI, S.; CHEN, Y.; WANG, Y.; YAN, X. Comparative Proteomics of Salt Tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. **Proteins**, Washington, p. 2584–2599, 2010.
- PARIDA, A. K.; DAS, A. B.; MITTRA, B. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. **Trees - Structure and Function**, [s.l], v. 18, n. 2, p. 167–174, 2004.
- PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotox. Environ. Safe.**, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 324–349, 2005.
- PASSARDI, F.; BAKALOVIC, N.; TEIXEIRA, F. K.; MARGIS-PINHEIRO, M.; PENEL, C.; DUNAND, C. Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. **Genomics**, USA, v. 89, n. 5, p. 567–579, 2007.
- PASTORI, G. M.; FOYER, C. H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology**, USA, v. 129, n. 2, p. 460–468, 2002.
- PETROV, V. D.; VAN BREUSEGEM, F. Hydrogen peroxide--a central hub for information flow in plant cells. **AoB Plants**, England, v. 2012, p. pls014–pls014, 4 jun. 2012.
- PETRUCCO, S.; BOLCHI, A.; FORONI, C.; PERCUDANI, R.; EROSSI, G. L.; OTTONELLO, S. A maize gene encoding an NADPH binding enzyme highly homologous to

- isoflavone reductases is activated in response to sulfur starvation. **The Plant Cell**, USA, v. 8, n. 1, p. 69–80, 1996.
- PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, India, v. 30, n. 1, p. 11–26, 15 jan. 2015.
- POLIDOEROS, A. N.; MYLONA, P. V.; PASENTSIS, K.; SCANDALIOS, J. G.; TSAFTARIS, A. S. The maize alternative oxidase 1A (AOX1A) gene is regulated by signals related to oxidative stress. **Redox report : communications in free radical research**, England, v. 10, n. 2, p. 71–8, 2005.
- POSPÍŠIL, P.; ARATÓ, A.; KRIEGER-LISZKAY, A.; RUTHERFORD, A. W. Hydroxyl Radical Generation by Photosystem II. **Biochemistry**, Washington, v. 43, n. 21, p. 6783–6792, jun. 2004.
- POTIKHA, T. S.; COLLINS, C. C.; JOHNSON, D. I.; DELMER, D.; P.; LEVINE, A. The Involvement of Hydrogen Peroxide in the Differentiation of Secondary Walls in Cotton Fibers. **Plant Physiology**, USA, v. 119, n. 3, p. 849–858, 1999.
- PRAXEDES, S. C.; DE LACERDA, C.; DAMATTA, F. M.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Salt tolerance is associated with differences in ion accumulation, biomass allocation and photosynthesis in cowpea cultivars. **Journal of Agronomy and Crop Science**, [s.l], v. 196, n. 3, p. 193–204, 2010.
- PUREV, M.; KIM, M. K.; SAMDAN, N.; YANG, D.-C. Isolation of a novel fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene from *Codonopsis lanceolata* and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. **Molekuliarnaia biologiiia**, Russia, v. 42, n. 2, p. 206–13, 2008.
- QU, N.; GAN, W.; BI, D.; XIA, S.; LI, X.; ZHANG, Y. Two BTB proteins function redundantly as negative regulators of defense against pathogens in *Arabidopsis*. **Botany**, [s.l], v. 88, n. 11, p. 953–960, nov. 2010.
- QURESHI, M. I.; QADIR, S.; ZOLLA, L. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 164, n. 10, p. 1239–1260, 2007.
- RAZEM, F. A. An overview of hydrogen peroxide production and cellular determination in plants. **Hebron University Research Journal**, [s.l], v. 3, n. 2, p. 84–96, 2008.
- RHOADS, D. M.; L., U. A.; SUBBIAIAH C. C.; SIEDOW, J. N. Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling. **Plant Physiology**, USA, v. 141, n. 2, p. 357–366, 2006.
- ROCHA, M. de M.; FREIRE FILHO, F.R. **Feijão-caupi (Grãos)**. Agência de Informação Embrapa, MAPA. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arvore/CONTAG01/\\_56\\_510200683537](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arvore/CONTAG01/_56_510200683537)>. Acesso em 02/05/2016.
- RODRIGO-MORENO, A.; BOSE, J.; SHABALA, S. EROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, England, v. 65, n. 5, p. 1241–1257, 1 mar. 2013.



- RODRIGUEZ, A. A.; CÓRDOBA, A. R.; ORTEGA, L.; TALEISNIK, E. Decreased reactive oxygen species concentration in the elongation zone contributes to the reduction in maize leaf growth under salinity. **Journal of Experimental Botany**, England, v. 55, n. 401, p. 1383–1390, 2004.
- ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; LE BIHAN, M. C.; THAYSEN-ANDERSEN, M.; ROEPSTORFF, P. 2D gels still have a niche in proteomics. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 88, p. 4–13, 2013.
- ROS BARCELÓ, A. Xylem parenchyma cells deliver the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necessary for lignification in differentiating xylem vessels. **Planta**, Germany, v. 220, n. 5, p. 747–756, 2005.
- ROSA, S. B.; CAVERZAN, A.; TEIXEIRA, F. K.; LAZZAROTTO, F.; SILVEIRA, J. A. G.; FERREIRA-SILVA, S. L.; ABREU-NETO, J.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. **Phytochemistry**, England, v. 71, n. 5-6, p. 548–558, 2010.
- REGELSBERGER, G.; JAKOPITSCH, C.; PLASSER, L.; SCHWAIGER, H.; FURTMÜLLER, P. G.; PESCHEK, G. A.; ZÁMOCKÝ, M.; OBINGER, C. Occurrence and biochemistry of hydroperoxidases in oxygenic phototrophic prokaryotes (cyanobacteria). **Plant Physiology and Biochemistry**, France, v. 40, n. 6-8, p. 479–490, 2002.
- RENGEL, Z. The role of calcium in salt toxicity. **Plant, Cell and Environment**, Denmark, v. 15, p. 625–632, 1992.
- RUBAN, A. V.; JOHNSON, M. P.; DUFFY, C. D. P. The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, [s.l.], v. 1817, n. 1, p. 167–181, jan. 2012.
- SAHA, J.; BRAUER, E. K.; SENGUPTA, A.; POPESCU, S. C.; GUPTA, K.; GUPTA, B. Polyamines as redox homeostasis regulators during salt stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, [s.l.], v. 3, 1 abr. 2015.
- SAIRAM, R. K.; TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, [s.l.], v. 86, n. 3, p. 407–421, 2004.
- SALEKDEH, G. H.; KOMATSU, S. Crop proteomics: Aim at sustainable agriculture of tomorrow. **Proteomics**, Amsterdam, v. 7, n. 16, p. 2976–2996, 2007.
- SATHIYARAJ, G.; SRINIVASAN, S.; KIM, Y.-J.; LEE, O. R.; PARVIN, S.; BALUSAMY, S. R. D.; KHOROLRAGCHAA, A.; YANG, D. C. Acclimation of hydrogen peroxide enhances salt tolerance by activating defense-related proteins in *Panax ginseng* C.A. Meyer. **Molecular Biology Reports**, Netherlands, v. 41, n. 6, p. 3761–3771, 1 jun. 2014.
- SAVVIDES, A.; ALI, S.; TESTER, M.; FOTOPOULOS, V. Chemical Priming of Plants Against Multiple Abiotic Stresses: Mission Possible? **Trends in Plant Science**, Inglaterra, v. 21, n. 4, p. 329–340, abr. 2016.
- SAXENA, S. C.; KAUR, H.; VERMA, P.; PETLA, B. P.; ANDUGULA, V. R.; MAJEE, M. Osmoprotectants: Potential for Crop Improvement Under Adverse Conditions. In: **Plant Acclimation to Environmental Stress**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 197–232.

SCANDALIOS, J. G. The rise of EROS. **Trends in Biochemical Sciences**, [s.l], v. 27, n. 9, p. 483–486, 2002.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 38, n. 7, p. 995–1014, jul. 2005.

SCHALLER, A.; STINTZI, A. Enzymes in jasmonate biosynthesis - Structure, function, regulation. **Phytochemistry**, England, v. 70, n. 13-14, p. 1532–1538, 2009.

SCHUSTER, G.; GRUISSEM, W. Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. **Embo J**, England, v. 10, n. 6, p. 1493–1502, 1991.

SHABALA, S.; BOSE, J.; HEDRICH, R. Salt bladders: do they matter? **Trends in Plant Science**, England, v. 19, n. 11, p. 687–691, nov. 2014.

SHAHBAZ, M.; ASHRAF, M. Improving Salinity Tolerance in Cereals. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s.l], v. 32, n. July, p. 237–249, 2013.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, [s.l], v. 2012, p. 1–26, 2012.

SEWELAM, N.; JASPERT, N.; VAN DER KELEN, K.; TOGNETTI, V. B.; SCHMITZ, J.; FRERIGMANN, H.; STAHL, E.; ZEIER, J.; VAN BREUSEGEM, F.; MAURINO, V. G. Spatial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Signaling Specificity: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from Chloroplasts and Peroxisomes Modulates the Plant Transcriptome Differentially. **Molecular Plant**, Oxford, England, v. 7, n. 7, p. 1191–1210, jul. 2014.

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

SHEVCHENKO, A.; SUNYAEV, S.; LOBODA, A.; SHEVCHENKO, A.; BORK, P.; ENS, W.; STANDING, K. G. Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. **Analytical Chemistry**, [s.l], v. 73, n. 9, p. 1917–1926, 2001.

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

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 U S A**, Washington, v. 97, p. 6896–6901, 2000.

SHI, Y.-F.; WANG, D.-L.; WANG, C.; CULLER, A. H.; KREISER, M. A.; SURESH, J.; COHEN, J. D.; PAN, J.; BAKER, B.; LIU, J.-Z. Loss of GSNOR1 Function Leads to Compromised Auxin Signaling and Polar Auxin Transport. **Molecular Plant**, [s.l], v. 8, n. 9, p. 1350–1365, set. 2015.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of experimental botany**, England, v. 53, n. 372, p. 1305–1319, 2002.

SILVA, J. V.; DE LACERDA, C. F.; DA COSTA, P. H. A.; ENÉAS FILHO, J.; GOMES FILHO, E.; PRISCO, J. T. Physiological responses of NaCl stressed cowpea plants grown in nutrient solution supplemented with CaCl<sub>2</sub>. **Brasilian Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 15, n. 2, p. 99–105, 2003.

SILVA, R. P.; SANTOS, C. E.; LIRA JUNIOR, M. A.; STAMFORD, N. P. Efetividade de estirpes selecionadas para feijão caupi em solo da região semi-árida do sertão da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 3, n. 2, p. 105–110, 2008.

SOBHANIAN, H.; MOTAMED, N.; JAZII, F. R.; NAKAMURA, T.; KOMATSU, S. Salt stress induced differential proteome and metabolome response in the shoots of *Aeluropus lagopoides* (poaceae), a halophyte C<sub>4</sub> plant. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, n. 6, p. 2882–2897, 2010.

SOBHANIAN, H.; AGHAEI, K.; KOMATSU, S. Changes in the plant proteome resulting from salt stress: Toward the creation of salt-tolerant crops? **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 8, p. 1323–1337, 2011.

SOFO, A.; SCOPA, A.; NUZZACI, M.; VITTI, A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l], v. 16, n. 6, p. 13561–13578, 2015.

SONNEWALD, U.; LERCHL, J.; ZRENNER, R.; FROMMER, W. Manipulation of sink-source relations in transgenic plants. **Plant, Cell and Environment**, Denmark, v. 17, n. 5, p. 649–658, maio 1994.

SPREITZER, R. J.; SALVUCCI, M. E. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. **Annual review of plant biology**, USA, v. 53, n. 1, p. 449–75, 2002.

STEELE, W.; MEHRA, K. **Structure, evolution, and adaptation to farming systems and environments in Vigna**. (D. . SUMMERFIELD, A. H. BUNTING, Eds.) Advances in Legume Science. England: Royol Botanic Gardens, 1980. Disponível em: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/19800704691.html>>. Acesso em: 05 jun. 2016.

STOGIOS, P. J.; DOWNS, G. S.; JAUHAL, J. J. S.; NANDRA, S. K.; PRIVÉ, G. G. Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. **Genome Biology**, London, v. 6, n. 10, p. R82, 2005.

SUGIHARA, K. Molecular Characterization of cDNA Encoding Oxygen Evolving Enhancer Protein 1 Increased by Salt Treatment in the Mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. **Plant and Cell Physiology**, Japan, v. 41, n. 11, p. 1279–1285, 1 nov. 2000.

SUN, J.; JIA, Y. X.; GUO, S. R.; LI, J.; SHU, S. Resistance of spinach plants to seawater stress is correlated with higher activity of xanthophyll cycle and better maintenance of chlorophyll metabolism. **Photosynthetica**, [s.l], v. 48, n. 4, p. 567–579, 2010.

SUORSA, M.; RANTALA, M.; DANIELSSON, R.; JARVI, S.; PAAKKARINEN, V.; SCHRODER, W. P.; STYRING, S.; MAMEDOV, F.; ARO, E. M. Dark-adapted spinach thylakoid protein heterogeneity offers insights into the photosystem II repair cycle. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1837, n. 9, p. 1463–1471, 2014.

SUSS, K. H.; ARKONA, C.; MANTEUFFEL, R.; ADLER, K. Calvin cycle multienzyme complexes are bound to chloroplast thylakoid membranes of higher plants in situ. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 12, p. 5514–8, 1993.

SZE, H.; LI, X.; PALMGREN, M. Energization of plant cell membranes by H<sup>+</sup>-pumping ATPases. Regulation and biosynthesis. **The Plant Cell**, USA, v. 11, n. 4, p. 677–690, 1999.

TAHIR, M. A.; AZIZ, T.; FAROOQ, M.; SARWAR, G. Silicon-induced changes in growth, ionic composition, water relations, chlorophyll contents and membrane permeability in two salt-stressed wheat genotypes. **Archives of Agronomy and Soil Science**, [s.l], v. 58, n. 3, p. 247–256, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TALUKDAR, D. Growth Responses and Leaf Antioxidant Metabolism of Grass Pea (*Lathyrus sativus* L.) Genotypes under Salinity Stress. **ISRN Agronomy**, [s.l], v. 2013, p. 1–15, 2013.

TANOUE, G.; JOB, C.; RAJJOU, L.; ARC, E.; BELGHAZI, M.; DIAMANTIDIS, G.; MOLASSIOTIS, A.; JOB, D. Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. **The Plant Journal**, Inglaterra, England, v. 60, n. 5, p. 795–804, dez. 2009.

TEIXEIRA, F. K.; MENEZES-BENAVENTE, L.; GALVÃO, V. C.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. **Planta**, Germany, v. 224, n. 2, p. 300–314, 2006.

TRIVEDI, D. K.; GILL, S. S.; YADAV, S.; TUTEJA, N. Genome-wide analysis of glutathione reductase (GR) genes from rice and *Arabidopsis*. **Plant signaling & behavior**, Georgetown, USA, v. 8, n. 2, p. e23021, 2013.

TSUKAGOSHI, H.; BUSCH, W.; BENFEY, P. N. Transcriptional Regulation of EROS Controls Transition from Proliferation to Differentiation in the Root. **Cell**, Cambridge, v. 143, n. 4, p. 606–616, nov. 2010.

UCHIDA, A.; JAGENDORF, A. T.; HIBINO, T.; TAKABE, T.; TAKABE, T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Science**, Amsterdam, v. 163, p. 515–523, 2002.

USDA-ARS. 2008. **Research databases. Bibliography on salt tolerance**. George E. Brown, Jr. Salinity Lab. US Dep. Agric. Res. Serv. Riverside, CA. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8908>>. Acesso em: 20 mar 2016.

- VAIDYANATHAN, H.; SIVAKUMAR, P.; CHAKRABARTY, R.; THOMAS, G. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa L.*) - Differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. **Plant Science**, Amsterdam, v. 165, n. 6, p. 1411–1418, 2003.
- VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVA, E.; DAT, J. F.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Amsterdam, v. 161, p. 405–414, 2001.
- VEERANAGAMALLAIAH, G.; CHANDRAOBULREDDY, P.; JYOTHSNAKUMARI, G.; SUDHAKAR, C. Glutamine synthetase expression and pyrroline-5-carboxylate reductase activity influence proline accumulation in two cultivars of foxtail millet (*Setaria italica L.*) with differential salt sensitivity. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 239–244, 2007.
- VIITANEN, P. V.; SCHMIDT, M.; BUCHNER, J.; SUZUKI, T.; VIERLING, E.; DICKSON, R.; LORIMER, G. H.; GATENBY, A.; SOLL, J. Functional characterization of the higher plant chloroplast chaperonins. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 270, n. 30, p. 18158–18164, 1995.
- WANG, Y.; NII, N. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, [s.l.], v. 75, n. 6, p. 623–627, 2000.
- WANG, B.; LÜTTGE, U.; RATAJCZAK, R. Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. **Journal of experimental botany**, England, v. 52, n. 365, p. 2355–2365, 2001.
- WANG, Y.; LI, J.; WANG, J.; LI, Z. Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> improves the chilling tolerance of manilagrass and mascarenegrass by activating the antioxidative system. **Plant Growth Regulation**, [s.l.], v. 61, n. 2, p. 195–204, 10 jun. 2010.
- WANG, N.; XIAO, B.; XIONG, L. Identification of a cluster of PR4 -like genes involved in stress responses in rice. **Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 168, n. 18, p. 2212–2224, 2011.
- WANG, Y.; ZHANG, J.; LI, J.-L.; MA, X.-R. Exogenous hydrogen peroxide enhanced the thermotolerance of *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne* by increasing the antioxidative capacity. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s.l.], v. 36, n. 11, p. 2915–2924, 5 nov. 2014.
- WANG, L.; PAN, D.; LI, J.; TAN, F.; HOFFMANN-BENNING, S.; LIANG, W.; CHEN, W. Proteomic analysis of changes in the *Kandelia candel* chloroplast proteins reveals pathways associated with salt tolerance. **Plant Science**, Amsterdam, v. 231, p. 159–172, 2015.
- WANG, X.; MA, X.; XINQUAN-ZHANG; LINKAI-HUANG; LI, Z.; NIE, W.-X. G. Analysis of Antioxidant Enzyme Activity and Antioxidant Genes Expression During Germination of Two Different Genotypes of *Lolium multiflorum* Under Salt Tolerance. **Protein and peptide letters**, [s.l.], v. 23, n. 5, p. 433–41, 2016.
- WEI, S.; HU, W.; DENG, X.; ZHANG, Y.; LIU, X.; ZHAO, X.; LUO, Q.; JIN, Z.; LI, Y.; ZHOU, S.; SUN, T.; WANG, L.; YANG, G.; HE, G. A rice calcium-dependent protein kinase

OsCPK9 positively regulates drought stress tolerance and spikelet fertility. **BMC Plant Biology**, [s.l], v. 14, n. 1, p. 133, 2014.

WETTSTEIN, D.; GOUGH, S.; KANNANGARA, C. Chlorophyll Biosynthesis. **The Plant Cell Online**, USA, v. 7, n. 7, p. 1039–1057, 1 jul. 1995.

WIJNTJES, E.; VAN AMERONGEN, H.; CROCE, R. LHCII is an antenna of both photosystems after long-term acclimation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1827, n. 3, p. 420–426, mar. 2013.

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, G.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/technology* (Nature Publishing Company), England, v. 14, n. September 2015, p. 61–65, 1996.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J.-C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, England, v. 13, n. July 2015, p. 19–50, 1996b.

WILLEKENS, H.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN CAMP, W. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, [s.l], v. 1, n. 3, p. 207–228, set. 1995.

XIONG, L.; ZHU, J. K. Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 112, p. 152–166, 2001.

XIONG, Y.; DEFRAIA, C.; WILLIAMS, D.; ZHANG, X.; MOU, Z. Deficiency in a cytosolic ribose-5-phosphate isomerase causes chloroplast dysfunction, late flowering and premature cell death in Arabidopsis. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v. 137, n. 3, p. 249–263, 2009.

XIONG, S.; YAO, X.; LI, A. Antioxidant Properties of Peptide from Cowpea Seed. **International Journal of Food Properties**, [s.l], v. 16, p. 1245–1256, 2013.

XU, B.; CHANG, S. K. C. Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines. **Food Chemistry**, England, v. 134, n. 3, p. 1287–1296, 2012.

XU, J.; LAN, H.; FANG, H.; HUANG, X.; ZHANG, H.; HUANG, J. Quantitative Proteomic Analysis of the Rice (*Oryza sativa L.*) Salt Response. **PLoS One**, San Francisco, USA, v. 10, n. 3, p. e0120978, 20 mar. 2015.

YAMADA, S.; KOMORI, T.; HASHIMOTO, A.; KUWATA, S.; IMASEKI, H.; KUBO, T. Differential expression of plastidic aldolase genes in Nicotiana plants under salt stress. **Plant Science**, Amsterdam, v. 154, n. 1, p. 61–69, 2000.

YAMAMOTO, Y.; NISHIMURA, M. Organization of the oxygen evolution enzyme complex in a highly active O<sub>2</sub>-evolving photosystem II preparation. In: Inoue *et al.* (Ed.). **The oxygen evolving system of photosynthesis**. Tokyo: Academic Press, 1983. p. 229–238.

YAMAMOTO, Y. Quality Control of Photosystem II. [s.l], v. 42, n. 2, p. 121–128, 2001.

YAMAGUCHI, T.; BLUMWALD, E. Developing salt-tolerant crop plants: Challenges and opportunities. **Trends in Plant Science**, England, v. 10, n. 12, p. 615–620, 2005.

YAMAUCHI, Y.; FURUTERA, A.; SEKI, K.; TOYODA, Y.; TANAKA, K.; SUGIMOTO, Y. Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, France, v. 46, n. 8-9, p. 786–793, 2008.

YAMAUCHI, Y.; HASEGAWA, A.; TANINAKA, A.; MIZUTANI, M.; SUGIMOTO, Y. NADPH-dependent reductases involved in the detoxification of reactive carbonyls in plants. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 286, n. 9, p. 6999–7009, 2011.

YAMAUCHI, Y.; HASEGAWA, A.; MIZUTANI, M.; SUGIMOTO, Y. Chloroplastic NADPH-dependent alkenal/one oxidoreductase contributes to the detoxification of reactive carbonyls produced under oxidative stress. **FEBS Letters**, England, v. 586, n. 8, p. 1208–1213, 2012.

YAO, Y. X.; DONG, Q. L.; ZHAI, H.; YOU, C. X.; HAO, Y. J. The functions of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene in growth and tolerance to cold and salt stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, France, v. 49, n. 3, p. 257–264, 2011.

YOUNG, J. J.; MEHTA, S.; ISRAELSSON, M.; GODOSKI, J.; GRILL, E.; SCHROEDER, J. I. CO<sub>2</sub> signaling in guard cells: Calcium sensitivity response modulation, a Ca<sup>2+</sup>-independent phase, and CO<sub>2</sub> insensitivity of the *gca2* mutant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 19, p. 7506–7511, 9 maio 2006.

YU, S.; ZHANG, X.; GUAN, Q.; TAKANO, T.; LIU, S. Expression of a carbonic anhydrase gene is induced by environmental stresses in Rice (*Oryza sativa L.*). **Biotechnology Letters**, Netherlands, v. 29, n. 1, p. 89–94, 2007.

ZHANG, M.; QIN, Z.; LIU, X. Remote sensed spectral imagery to detect late blight in field tomatoes. **Precision Agriculture**, [s.l.], v. 6, n. 6, p. 489–508, 2005.

ZHANG, L.; CHENG, Z.; QIN, R.; QIU, Y.; WANG, J.-L.; CUI, X.; GU, L.; ZHANG, X.; GUO, X.; WANG, D.; JIANG, L.; WU, C. -Y.; WANG, H.; CAO, X.; WAN, J. Identification and Characterization of an Epi-Allele of FIE1 Reveals a Regulatory Linkage between Two Epigenetic Marks in Rice. **The Plant Cell**, USA, v. 24, n. 11, p. 4407–4421, 1 nov. 2012.

ZHANG, X.-F.; JIANG, T.; WU, Z.; DU, S.-Y.; YU, Y.-T.; JIANG, S.-C.; LU, K.; FENG, X.-J.; WANG, X.-F.; ZHANG, D.-P. Cochaperonin CPN20 negatively regulates abscisic acid signaling in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 83, n. 3, p. 205–218, 20 out. 2013.

ZHANG, H.; LIU, Y.; WEN, F.; YAO, D.; WANG, L.; GUO, J.; NI, L.; ZHANG, A.; TAN, M.; JIANG, M. A novel rice C2H2-type zinc finger protein, ZFP36, is a key player involved in abscisic acid-induced antioxidant defence and oxidative stress tolerance in rice. **Journal of Experimental Botany**, England v. 65, n. 20, p. 5795–5809, 1 nov. 2014.

ZHANG, L.; MA, H.; CHEN, T.; PEN, J.; YU, S.; ZHAOE, X. Morphological and physiological responses of cotton (*Gossypium hirsutum l.*) plants to salinity. **PLoS ONE**, San Francisco, USA, v. 9, n. 11, 2014b.

ZHOU, J.; XIA, X.-J.; ZHOU, Y.-H.; SHI, K.; CHEN, Z.; YU, J.-Q. RBOH1 -dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and subsequent activation of MPK1/2 play an important role in acclimation-induced cross-tolerance in tomato. **Journal of Experimental Botany**, England, v. 65, n. 2, p. 595–607, fev. 2014.

ZHU, H.; BILGIN, M.; SNYDER, M. Proteomics. **Annual Review of Biochemistry**, USA, v. 72, p. 783–812, 2003.

ZOELLER, M.; STINGL, N.; KRISCHKE, M.; FEKETE, A.; WALLER, F.; BERGER, S.; MUELLER, M. J. Lipid profiling of the *Arabidopsis* hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: biogenesis of pimelic and azelaic acid. **Plant Physiology**, USA, v. 160, n. 1, p. 365–378, 2012.

ZOUNI, A; WITT, H. T.; KERN, J.; FROMME, P.; KRAUSS, N.; SAENGER, W.; ORTH, P. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. **Nature**, Inglaterra, England, v. 409, n. 1988, p. 739–743, 2001.