



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

BEATRIZ DE SOUSA E LIMA

**TOLERÂNCIA DE GENÓTIPOS DE *Vigna unguiculata* AO ESTRESSE SALINO:
INTEGRAÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES, FISIOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS**

FORTALEZA
2017

BEATRIZ DE SOUSA E LIMA

TOLERÂNCIA DE GENÓTIPOS DE *Vigna unguiculata* AO ESTRESSE SALINO:
INTEGRAÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES, FISIOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Ciências Biológicas II.

Orientador: Prof. Dr. José Hélio Costa

FORTALEZA
2017

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)

- L696t Lima, Beatriz de Sousa e.
Tolerância de genótipos de *Vigna unguiculata* ao estresse salino: Integração dos mecanismos moleculares, fisiológicos e bioquímicos / Beatriz de Sousa e Lima. – 2017.
139 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. José Hélio Costa.
1. Feijão-caupi. 2. Salinidade. 3. Aclimação ao estresse. 4. Transcriptoma. 5. RNA-seq. I. Título.
CDD 572
-

BEATRIZ DE SOUSA E LIMA

TOLERÂNCIA DE GENÓTIPOS DE *Vigna unguiculata* AO ESTRESSE SALINO:
INTEGRAÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES, FISIOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Ciências Biológicas II.

Aprovada em 09/10/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Hélio Costa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Rafael de Souza Miranda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Murilo Siqueira Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Fabrício Eulálio Leite Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Lopes de Sousa
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus
À minha família

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir chegar ao final dessa difícil jornada e alcançar essa conquista;

À **UFC** pela infraestrutura e apoio no desenvolvimento da pesquisa e ao programa de pós-graduação em Bioquímica e Biologia molecular da UFC, em especial os professores, pela valorosa formação adquirida durante a realização do curso, na contribuição ao meu crescimento acadêmico e profissional;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela bolsa de doutorado concedida e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (**INCT-Sal/CNPq**) pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho;

Ao meu orientador, prof. Dr. José Hélio Costa, pela oportunidade de aprendizado, por todos os ensinamentos nesses quatro anos, o meu agradecimento;

Ao Dr. Rafael de Souza Miranda, por toda a paciência, disponibilidade, atenção e por compartilhar um pouco do seu conhecimento, muito obrigada;

Aos membros da banca examinadora: Dr. Bruno Lopes de Sousa, Dr. Murilo Siqueira Alves e Dr. Fabrício Eulálio Leite Carvalho, pelo tempo dedicado a esse trabalho e pelas colaborações, críticas e sugestões, muito obrigada;

Ao professor Enéas Gomes Filho, pela concessão da utilização do seu laboratório e casa de vegetação, para a realização das análises;

À minha família, pelo carinho e compreensão nos muitos momentos de ausência, por todo o apoio! Em especial a meus pais, que foram os meus maiores torcedores, sem eles eu não teria chegado até aqui!

Ao Danilo, por toda a compreensão diante das muitas ausências, pelo carinho e companheirismo, meu agradecimento;

Aos amigos do laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática que compartilharam as longas horas de trabalho necessárias para que essa tese ficasse pronta. Um agradecimento especial à Kátia e Clesivan, que foram indispensáveis nessa caminhada, nos momentos bons e ruins, a amizade, paciência e disponibilidade. Muito obrigada também aos colegas André, Rachel, Thaís, Karine, Sarah, Fernanda, Matias, Moarcília, Lindefânia por toda a ajuda prestada nesses anos;

Às amigas que mesmo distante estavam na torcida, Joanna e Michelle! Obrigada por toda a força e amizade! Agradecimento também à Camila, que esteve presente nessa caminhada desde a graduação, por sua amizade e companheirismo, muito obrigada!

*“Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades...
Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram
conquistas do que parecia impossível”.*

Charlie Chaplin

RESUMO

A produção agrícola tem se tornado um desafio nas regiões áridas e semi-áridas de todo o mundo, resultado da incidência constante de fatores ambientais adversos, como é o caso dos estresses abióticos. Dentre eles, o excesso de sais no solo caracteriza-se por limitar severamente o crescimento e desenvolvimento das plantas, acarretando graves prejuízos devido ao baixo rendimento das culturas. Nesse cenário, a seleção de cultivares tolerantes à salinidade e/ou a engenharia genética de plantas emergem como estratégias de grande importância. Todavia, como a tolerância ao estresse é um fenômeno de natureza multigênica, a seleção/identificação das vias metabólicas, marcadores moleculares e de potenciais produtos gênicos constituem um desafio para os estudos sobre estresse salino em plantas. A presente pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de integrar os mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos envolvidos na tolerância de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) ao estresse salino. Para isso, plantas de dois genótipos de *V. unguiculata* dotados de tolerância diferencial ao estresse salino, Pitiúba e TVU, foram utilizadas como modelo experimental. O estresse salino promoveu reduções severas no crescimento das plantas de ambos os genótipos, contudo, uma maior produção de biomassa sob salinidade foi observada nas plantas do genótipo TVU, ao longo de todo o período experimental (8 e 16 dias). O melhor desempenho das plantas TVU foi atribuído a maior eficiência da maquinaria fotossintética, evidenciada pelas maiores taxas de assimilação de CO₂ e pela maior eficiência fotoquímica do fotossistema II (↑ taxa de transporte de elétrons – ETR e ↑ quenching fotoquímico - qP). Além disso, na presença de NaCl, a elevada eficiência fotossintética coincidiu com o maior conteúdo de pigmentos envolvidos na absorção de energia, tanto de clorofila *a*, *b* e total quanto de carotenoides. Tais respostas foram acompanhadas por incrementos na expressão dos genes *PGR5-like protein 1A*, *HEMA (Glutamyl-tRNA reductase-binding protein)*, *Light-harvesting complex I chlorophyll*, bem como de vários genes estruturais da CTE tilacoidal. Plantas TVU também limitaram o acúmulo excessivo de Na⁺ nos caules e folhas e, conseqüentemente, estabeleceram maior relação K⁺/Na⁺ sob estresse. Os resultados sugerem que o controle da homeostase iônica foi decorrente da ativação eficiente de rotas de defesa, envolvendo mecanismos de exclusão e compartimentalização de Na⁺, pois houve aumento na expressão de genes que codificam componentes da rota SOS e de genes da *V-ATPase*. Aliado a isso, observou-se menores danos oxidativos (↓ MDA) nos tecidos das plantas do genótipo TVU, resultado da ação efetiva de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. A maior atividade das enzimas SOD, APX e GPX foi correlacionada com a expressão dos genes *DEAD-box* e *Glutathione peroxidase*. Nesse genótipo, os genes envolvidos na sinalização por auxinas (IAA), ácido jasmônico (JA), giberelinas (GA), etileno (ETHY), ácido abscísico (ABA), H₂O₂, CIPK (*CIPK3* e *CIPK14*) e inúmeros fatores de transcrição (por exemplo, *WRKY*, *MYB* e *bZIP*) podem ter atuado na rede intrínseca de respostas que culminou na maior tolerância ao estresse salino. Contrariamente, a maior sensibilidade das plantas do genótipo Pitiúba ao estresse salino foi associada com a menor eficiência da maquinaria fotossintética e o acúmulo excessivo de íons tóxicos nos tecidos aéreos. Sob salinidade, os decréscimos nas taxas de assimilação de CO₂ foram resultado de danos severos ao aparato fotossintético, pois a eficiência quântica máxima do

PSII (Fv/Fm) foi seriamente comprometida logo após o início do estresse, sendo esse efeito intensificado com a imposição do tratamento salino. Associado a isso, houve uma redução progressiva na eficiência quântica efetiva do PSII (ϕ PSII), que foi acompanhada por decréscimos na ETR, bem como pela maior dissipação não fotoquímica de elétrons, principalmente nos últimos tempos de análise. Outro fator determinante para a menor eficiência da maquinaria fotossintética foi o baixo acúmulo de pigmentos fotossintéticos, o que provavelmente resultou no acúmulo de energia no PSII e na maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esse fenômeno pode ter ocasionado danos as membranas celulares (\uparrow MDA), o que intensificou a degradação dos pigmentos fotossintéticos e de outros componentes estruturais dos fotossistemas. Como resultado da menor eficiência fotoquímica, as taxas fotossintéticas (assimilação de CO₂) foram seriamente comprometidas pela salinidade o que, conseqüentemente, restringiu o crescimento das plantas. Os resultados do RNAseq demonstraram que as plantas Pitiúba também acionaram um arsenal de genes em resposta ao estresse, incluindo aqueles voltados para o controle da homeostase iônica e redox, reparo dos fotossistemas, hormônios, fatores de transcrição, dentre outros. Entretanto, tais mecanismos não foram suficientes para mitigar os efeitos deletérios do NaCl e as plantas foram altamente sensíveis ao estresse salino. No presente estudo foram identificadas as principais vias metabólicas possivelmente envolvidas na tolerância à salinidade de plantas de *V. unguiculata*, além de genes potenciais para estudos de melhoramento genético de plantas.

Palavras-chave: Feijão-caupi. Salinidade. Aclimação ao estresse. Transcriptoma. RNA-seq.

ABSTRACT

Agricultural production has become a challenge in the arid and semi-arid regions of the world, as a result of the constant incidence of adverse environmental factors, such as abiotic stresses. Among them, the excess of salts in the soil is characterized by severely limiting the growth and development of the plants, causing serious damages due to the low yield of the crops. In this scenario, the selection of cultivars tolerant to salinity and / or genetic engineering of plants emerge as strategies of great importance. However, because stress tolerance is a multigenic phenomenon, the selection / identification of metabolic pathways, molecular markers and potential gene products constitute a challenge for studies on saline stress in plants. The present research was developed with the objective of integrating the molecular, biochemical and physiological mechanisms involved in the tolerance of cowpea (*Vigna unguiculata*) plants to saline stress. For this, plants of two genotypes of *V. unguiculata* endowed with differential tolerance to saline stress, Pitiúba and TVU, were used as experimental model. Saline stress promoted severe reductions in plant growth of both genotypes; however, increased biomass production under salinity was observed in TVU genotypes throughout the experimental period (8 and 16 days). The best performance of the TVU plants was attributed to the higher efficiency of the photosynthetic machinery, evidenced by the higher CO₂ assimilation rates and by the higher photochemical efficiency of photosystem II (\uparrow electron transport rate - ETR and \uparrow photochemical quenching - qP). In addition, in the presence of NaCl, the high photosynthetic efficiency coincided with the higher pigment content involved in the energy absorption of both chlorophyll a, b and total as well as carotenoids. Such responses were accompanied by increases in the expression of the PGR5-like protein 1A, HEMA (Glutamyl-tRNA reductase-binding protein), Light-harvesting complex I chlorophyll, as well as several structural genes of the thylakoidal CTE. TVU plants also limited the excessive accumulation of Na⁺ in the stems and leaves and, consequently, established a higher K⁺ / Na⁺ ratio under stress. The results suggest that the control of ionic homeostasis was due to the efficient activation of defense routes, involving mechanisms of exclusion and Na⁺ compartmentalization, since there was an increase in the expression of genes encoding SOS route components and V-ATPase genes. In addition, lower oxidative damages (\downarrow MDA) were observed in plant tissues of the TVU genotype, a result of the effective action of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. The higher activity of the SOD, APX and GPX enzymes was correlated with the expression of the DEAD-box and Glutathione peroxidase genes. In this genotype, genes involved in auxin signaling (IAA), jasmonic acid (JA), gibberellins (GA), ethylene (ETHY), abscisic acid (ABA), H₂O₂, CIPK (CIPK3 and CIPK14) and innumerable transcription factors for example WRKY, MYB and bZIP) may have operated in the intricate network of responses that culminated in greater tolerance to salt stress. In contrast, the higher sensitivity of the Pitiúba genotype to saline stress was associated with the lower efficiency of the photosynthetic machinery and the excessive accumulation of toxic ions in the aerial tissues. Under salinity, decreases in CO₂ assimilation rates were due to severe damage to the photosynthetic apparatus, since the maximum quantum efficiency of PSII (Fv / Fm) was seriously compromised shortly after the onset of stress, and this effect was intensified with the imposition of saline treatment.

Associated with this, there was a progressive reduction in the effective quantum efficiency of the PSII (ϕ PSII), which was accompanied by decreases in the ETR, as well as by the greater non-photochemical dissipation of electrons, especially in the last times of analysis. Another determinant factor for the lower efficiency of the photosynthetic machinery was the low accumulation of photosynthetic pigments, which probably resulted in the accumulation of energy in PSII and the higher production of reactive oxygen species (ROS). This phenomenon may have caused damage to cell membranes (\uparrow MDA), which intensified the degradation of the photosynthetic pigments and other structural components of the photosystems. As a result of the lower photochemical efficiency, photosynthetic rates (CO₂ assimilation) were seriously compromised by salinity, which consequently restricted plant growth. The results of RNAseq demonstrated that Pitiúba plants also triggered an arsenal of genes in response to stress, including those focused on the control of ionic and redox homeostasis, photosystem repair, hormones, transcription factors, among others. However, such mechanisms were not sufficient to mitigate the deleterious effects of NaCl and the plants were highly sensitive to salt stress. In the present study, the main metabolic pathways involved in the tolerance to salinity of *V. unguiculata* plants were identified, as well as potential genes for genetic improvement studies.

Keywords: Cowpea. Salinity. Stress acclimatization. Transcriptome. RNA-seq.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa de distribuição do plantio de feijão-caupi em território brasileiro.	24
Figura 2	Disposição e condições de cultivo de plantas de feijão-de-corda, <i>Vigna unguiculata</i> , nas dependências da casa de vegetação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da UFC.	39
Figura 3	Qualidade das bibliotecas de RNA das folhas de plantas dos genótipos pitiúba (A e B) e TVU (C e D), gerados pelo FastQC após a filtragem das sequências de baixa qualidade com o Trimmomatic.	47
Figura 4	<i>MA plots</i> resultantes da comparação entre os logaritmos de contagem por milhão (logCPM) e de <i>fold change</i> (logFC) dos genes diferencialmente expressos (GDEs) nas folhas das plantas dos genótipos pitiúba e TVU, após 1 d de estresse salino com NaCl a 100 mM.	49
Figura 5	<i>MA plots</i> resultantes da comparação entre os logaritmos de contagem por milhão (logCPM) e de <i>fold change</i> (logFC) dos genes diferencialmente expressos (GDEs) nas folhas das plantas dos genótipos pitiúba e TVU, após 8 d de estresse salino com NaCl a 100 mM.	50
Figura 6	Diagramas de <i>Venn</i> mostrando o montante de genes diferencialmente expressos (GDEs) específicos e compartilhados entre as comparações estabelecidas.	52
Figura 7	Número e distribuição dos genes diferencialmente expressos (GDEs) nas diversas comparações entre os genótipos de <i>Vigna unguiculata</i> .	54
Figura 8	Classificação dos genes diferencialmente expressos (GDEs) nas folhas dos genótipos de <i>Vigna unguiculata</i> , Pitiúba e TVU, dentro das categorias ontológicas (GO) processo biológico, função molecular e componente celular.	56
Figura 9	Genes das vias sinalização/hormônios/respostas a estímulos expressos diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , genótipos Pitiúba (PIT) e TVU, após 1 dia de imposição do estresse salino.	57
Figura 10	Genes estruturais do fotossistema II expressos diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , genótipos Pitiúba (PIT) e TVU, após 1 dia de imposição do estresse salino.	58
Figura 11	Genes das vias glicolítica e das pentoses-fosfato expressos diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , genótipos Pitiúba (PIT) e TVU, após 1 dia de imposição do estresse salino.	59
Figura 12	Genes envolvidos na fosforilação oxidativa expressos diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , genótipos Pitiúba (PIT) e TVU, após 1 dia de imposição do estresse salino.	60
Figura 13	Genes do metabolismo do carbono expressos diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , genótipos Pitiúba (PIT) e TVU, após 1 dia de imposição do estresse salino.	61

Figura 14	Ontologia gênica (GO) dos genes diferencialmente expressos (GDEs) identificados na comparação Pitiúba Sal × TVU Sal (PS × TS), após 1 dia de estresse salino com NaCl a 100 mM.	63
Figura 15	Classificação dos genes diferencialmente expressos (GDEs) nas folhas dos genótipos de <i>Vigna unguiculata</i> , Pitiúba e TVU, dentro das categorias ontológicas (GO) processo biológico, função molecular e componente celular.	65
Figura 16	Genes do metabolismo do carbono expressos diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , genótipos Pitiúba (PIT) e TVU, após 8 dia de imposição do estresse salino.	66
Figura 17	Genes das vias sinalização/hormônios/respostas a estímulos expressos diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , genótipos Pitiúba (PIT) e TVU, após 8 dias de imposição do estresse salino	67
Figura 18	Genes estruturais do fotossistema II expressos diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , genótipos Pitiúba (PIT) e TVU, após 8 dias de imposição do estresse salino.	68
Figura 19	Gene da via de biossíntese de clorofilas expresso diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , genótipos Pitiúba (PIT), após 8 dias de imposição do estresse salino.	69
Figura 20	Ontologia gênica (GO) dos genes diferencialmente expressos (GDEs) identificados na comparação Pitiúba Sal × TVU Sal (PS × TS), após 8 dias de estresse salino com NaCl a 100 mM.	72
Figura 21	Área foliar e Massas secas das folhas, caule e raízes de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse).	74
Figura 22	Fotossíntese líquida (A) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse).	76
Figura 23	Taxas de condutância estomática (gs) e transpiração (E) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse).	77
Figura 24	Concentrações internas de CO ₂ (Ci) e eficiência de carboxilação da Rubisco (A/Ci) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse).	78
Figura 25	Eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm) e Eficiência quântica efetiva do PSII (ΦPSII) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse).	80
Figura 26	Taxa de transporte de elétrons (ETR) e Indicativo de dreno alternativo de elétrons (ETR/A) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse).	81
Figura 27	Coefficiente de dissipação fotoquímica (qP) e coeficiente de dissipação não fotoquímica (NPQ) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse).	83

Figura 28	Teores de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e total e de carotenoides de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse).	85
Figura 29	Teores de K ⁺ nas folhas, caules e raízes de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse).	86
Figura 30	Teores de Na ⁺ em folhas, caule e raízes de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse).	88
Figura 31	Relação K ⁺ /Na ⁺ em folhas, caule e raízes de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse).	89
Figura 32	Gene da via de biossíntese de clorofilas expresso diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> , genótipos Pitiúba (PIT), após 8 dias de imposição do estresse salino.	90
Figura 33	Ontologia gênica (GO) dos genes diferencialmente expressos (GDEs) identificados na comparação Pitiúba Sal × TVU Sal (PS × TS), após 8 dias de estresse salino com NaCl a 100 mM.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Total de <i>reads</i> de qualidade após processamento das bibliotecas de <i>Vigna unguiculata</i> .	46
Tabela 2	Número de genes diferencialmente expressos (GDEs) que apresentaram regulação positiva (<i>up</i>) e negativa (<i>down</i>), nas folhas de dois genótipos de <i>Vigna unguiculata</i> , em função dos diferentes tratamentos.	48
Tabela S1	Genes diferencialmente expressos (GDEs) nas folhas de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> após 1 e 8 dias de estresse salino com NaCl a 100mM.	122
Tabela S2	Genes que apresentaram expressão com o tempo de exposição ao estresse salino.	137

LISTA DE ABREVIATURAS

A	fotossíntese líquida
A/Ci	eficiência de carboxilação da rubisco
AF	área foliar
ABF	elemento responsivo ao ácido abscísico
AOX	oxidase alternativa
APX	peroxidase do ascorbato
ATP	adenosina trifosfato
BLAST	ferramenta básica de busca por alinhamento local
bZIP	zíper de leucina básico
CAT	catalase
CC	componente celular
CDK	quinases dependentes de ciclinas
cDNA	dna complementar
<i>C_i</i>	concentração interna de CO ₂
CONAB	companhia nacional de abastecimento
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNase	desoxirribonuclease
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
<i>E</i>	transpiração
EST	etiqueta de sequência expressa
ETR	taxa de transporte de elétrons
FAO	organização das nações unidas para agricultura e alimentação
Fv/Fm	eficiência máxima do fotossistema II
GenBank	banco de genes
GDE	gene diferencialmente expresso
GO	ontologia gênica
GPOD	peroxidase do guaiacol
<i>g_s</i>	condutância estomática
HAK	transportador de K ⁺ de alta afinidade
HKT	transportador de K ⁺ de alta afinidade
JA	ácido jasmônico

KAAS	servidor de anotação automática do KEGG
KEGG	enciclopédia de genes e genomas de kyoto;
KT	transportador de K^+ de alta afinidade
MAPK	proteína kinase ativada por mitose
MDA	malondialdeído
NCBI	centro nacional para informação biotecnológica;
NHX	transportador do tipo antiporte Na^+/H^+ de tonoplasto
NPQ	dissipação não fotoquímica
NR	não redundante
P-ATPase	bomba de protons H^+ -atpase de membrana plasmática
Pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PPase	bomba de protons H^+ -pirofosfatase de tonoplasto
PPi	pirofosfato
PSII	fotossistema II
qP	dissipação fotoquímica
RNA	ácido ribonucleico
ROS	espécies reativas de oxigênio
SOD	superóxido desmutase
SOS	rota de sinalização (do inglês, salt overly sensitive)
SOS1	transportador do tipo antiporte Na^+/H^+ de membrana plasmática
TF	fator de transcrição
V-ATPase	bomba de prótons H^+ - atpase de tonoplasto
Φ PSII	eficiência quântica efetiva do psii

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo Geral.....	22
2.2	Objetivos Específicos.....	22
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
3.1	Feijão-caupi.....	23
3.2	Estresse salino e seus efeitos sobre as plantas.....	25
3.3	Tolerância de plantas ao estresse salino.....	27
3.3.1	<i>Mecanismos fisiológicas e bioquímicas.....</i>	27
3.3.1.1	<i>Homeostase osmótica e iônica.....</i>	27
3.3.1.2	<i>Defesa antioxidante.....</i>	27
3.3.1.3	<i>Regulação hormonal.....</i>	29
3.3.2	<i>Mecanismos moleculares durante a aclimatação ao estresse.....</i>	30
3.4	Genômica Funcional: abordagem transcriptômica.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	Experimento 1 – Modulação do transcriptoma de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> sob condições de estresse salino.....	35
4.1.1	<i>Extração do RNA total.....</i>	35
4.1.2	<i>Quantificação e pureza do RNA.....</i>	35
4.1.3	<i>Análise Transcriptômica via Sequenciamento do RNA (RNA-seq).....</i>	36
4.1.3.1	<i>Construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento.....</i>	36
4.1.3.2	<i>Análises de Bioinformática.....</i>	36
4.1.3.2.1	Processamento dos dados (sequências) e montagem de transcritos.....	36
4.1.3.2.2	Identificação e análise dos genes diferencialmente expressos (GDEs)	37
4.1.3.2.3	Anotação dos genes diferencialmente expressos (GDEs) e ontologia gênica (GO).....	37
4.2	Experimento 2 - Fisiologia e bioquímica da tolerância de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> ao estresse salino.....	38
4.2.1	<i>Material Vegetal e condições experimentais.....</i>	38

4.2.2	<i>Coleta das plantas e medidas de crescimento.....</i>	40
4.2.3	<i>Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....</i>	40
4.2.4	<i>Determinação de pigmentos fotossintéticos.....</i>	41
4.2.5	<i>Determinação dos teores de íons inorgânicos.....</i>	41
4.2.6	<i>Peroxidação de lipídeos de membrana e atividade de enzimas antioxidantes.....</i>	42
4.2.6.1	<i>Preparo dos extratos.....</i>	42
4.2.6.2	<i>Peroxidação de lipídeos de membranas.....</i>	42
4.2.6.3	<i>Atividade das enzimas antioxidantes.....</i>	42
4.2.6.3.1	<i>Dismutase do superóxido.....</i>	42
4.2.6.3.2	<i>Catalase.....</i>	43
4.2.6.3.3	<i>Peroxidase do ascorbato.....</i>	43
4.2.6.3.4	<i>Peroxidase do guaiacol.....</i>	43
4.2.6.3.5	<i>Teores de proteínas solúveis.....</i>	44
4.2.7	<i>Delineamento Experimental e análise estatística.....</i>	44
5	RESULTADOS.....	45
5.1	Análise transcriptômica.....	45
5.1.1	<i>Extração e qualidade do RNA total.....</i>	45
5.1.2	<i>Sequenciamento, mapeamento e montagem de transcritos.....</i>	45
5.1.3	<i>Análise dos genes diferencialmente expressos (GDEs).....</i>	46
5.1.3.1	<i>Total de genes identificados e número de GDEs.....</i>	46
5.1.3.2	<i>Diagramas de dispersão (MA plots).....</i>	48
5.1.3.3	<i>Padrão de regulação dos GDEs.....</i>	51
5.1.4	<i>Categorização funcional dos GDEs (ontologia gênica - GO e identificação de vias metabólicas – KEGG).....</i>	53
5.2	Análises Fisiológicas e Bioquímicas.....	73
5.2.1	<i>Parâmetros de crescimento.....</i>	73
5.2.2	<i>Eficiência da maquinaria fotossintética.....</i>	75
5.2.3	<i>Pigmentos Fotossintéticos.....</i>	84
5.2.4	<i>Homeostase iônica.....</i>	85
5.2.5	<i>Danos oxidativos e sistema antioxidante</i>	90
6	DISCUSSÃO.....	93
6.1	A produção de biomassa sob salinidade depende do genótipo de V.	93

	<i>unguiculata</i> e do tempo de estresse.....	
6.2	A maior tolerância ao estresse salino do genótipo TVU é associada diretamente a alta eficiência da maquinaria fotossintética.....	94
6.3	Plantas do genótipo TVU regulam mais eficientemente a homeostase iônica e redox sob estresse salino.....	97
6.4	Rotas de sinalização e fatores de transcrição envolvidos nas respostas de plantas de feijão ao estresse salino.....	99
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
	REFERÊNCIAS.....	104
	ANEXO A.....	122
	<i>Genes diferencialmente expressos (GDEs) nas folhas de plantas de Vigna unguiculata, genótipos Pitiúba e TVU, após 1 e 8 dias de estresse salino com NaCl a 100 mM.</i>	
	ANEXO B.....	137
	<i>Genes que apresentaram expressão diferencial com o tempo de exposição ao estresse salino (Comparação 1d x 8d).</i>	

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) é uma espécie leguminosa, com metabolismo fotossintético C3, amplamente cultivada em regiões áridas e semiáridas do mundo, constituindo-se como um dos principais componentes da dieta alimentar de milhões de pessoas (FREIRE FILHO *et al.*, 2011). Popularmente conhecido como feijão-de-corda, fradinho ou macassar, é originário do continente africano. No cenário internacional, o Brasil encontra-se como o terceiro maior produtor do grão, sendo que seu cultivo ocorre ao longo de três épocas distintas, com destaque para as regiões Sudeste, Centro-oeste e Nordeste (COELHO *et al.*, 2016).

Fatores abióticos impõem graves desafios às plantas, podendo causar danos significativos ao seu crescimento e desenvolvimento e, conseqüentemente, ao rendimento das culturas de interesse econômico em todo o mundo (NEGRÃO *et al.*, 2017). A salinidade do solo é uma grande restrição ambiental para a produção agrícola, afetando cerca de 45 milhões de hectares de terras irrigadas, um problema que deverá ser intensificado com o passar dos anos devido às mudanças climáticas globais e às práticas de irrigação inadequadas (FAO, 2015).

A salinidade nos solos afeta os vegetais de diversas formas em decorrência de seus efeitos osmóticos e iônicos (FLOWERS; COLMER, 2015). Dessa forma, já é bem conhecido que o estresse salino compromete processos como a absorção de água, condutância estomática, fotossíntese, absorção de nutrientes, síntese de proteínas, assim como inúmeros processos metabólicos e, por fim, a produção de biomassa (ACOSTA-MOTOS *et al.*, 2017). O grau de severidade da salinidade sobre as plantas, entretanto, depende de muitos fatores, como espécie da planta, genótipo, idade, composição da solução salina, órgão afetado, além da severidade e duração do estresse (CRAMER *et al.*, 2011).

As plantas desenvolveram mecanismos complexos e altamente específicos para crescer em ambientes salinos, que envolvem respostas a nível fisiológico, bioquímico e molecular (PRISCO; GOMES-FILHO; MIRANDA, 2016). Essas respostas incluem eventos como a percepção e transdução do sinal, regulação da transcrição, transporte através de membranas, metabolismo de energia, fosforilação e desfosforilação de proteínas, atividade de enzimas, bem como alteração de rotas metabólicas (PARIDA, 2005; MUCHATE *et al.* 2016).

A aclimação/tolerância das plantas ao estresse salino é resultado de uma série de alterações na expressão de vários genes (GUPTA *et al.*, 2014, BAHMANI *et al.*, 2015). A ativação desses genes codifica produtos proteicos funcionais, um processo controlado

restritamente por um grupo de moléculas específicas, os fatores de transcrição (WANG *et al.*, 2016). Em conjunto, essas respostas possibilitam o reestabelecimento da homeostase e sobrevivência das plantas frente às condições estressantes.

Uma alternativa viável para atenuar o problema da salinidade sobre a produtividade agrícola seria a seleção de genótipos com maior capacidade de crescer em solos salinos ou o melhoramento genético (através da engenharia genética ou cruzamentos seguidos de seleção) de espécies cultivadas (AHANGER *et al.*, 2017, YUANHANG *et al.*, 2017). Assim, como a aclimação ao estresse é de natureza multigênica, a identificação de genes envolvidos nas respostas de plantas à salinidade é um processo chave para o entendimento dos mecanismos que conferem tolerância às plantas, além de auxiliar no desenvolvimento de cultivares adaptadas a essas condições.

Portanto, no presente estudo foi conduzida uma investigação detalhada do transcriptoma, via sequenciamento de RNA (RNA-seq), de genótipos de *V. unguiculata* para identificar genes e vias metabólicas envolvidas nas respostas de aclimação de plantas de feijão ao estresse salino, juntamente com análises fisiológicas e bioquímicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Investigar as alterações no transcriptoma de dois genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (Pitiúba e TVU) frente ao estresse salino, bem como correlacioná-las com as respostas fisiológicas e bioquímicas que resultam na tolerância à salinidade.

2.2 Específicos

- Analisar o transcriptoma, via RNA-seq, das folhas de dois genótipos de feijão-caupi e identificar genes diferencialmente expressos (GDEs) em resposta ao estresse salino;
- Realizar um estudo de ontologia gênica e identificar as vias metabólicas que compreendem os GDEs em resposta ao estresse salino;
- Determinar os parâmetros de crescimento (área foliar, massa seca das folhas, caules e raízes) de plantas dos genótipos Pitiúba e TVU submetidas ao estresse salino com NaCl a 100 mM;
- Mensurar os pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, total e carotenoides), as trocas gasosas (fotossíntese líquida, transpiração e condutância estomática) e os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* (eficiência quântica potencial e efetiva do fotossistema II, coeficientes de extinção fotoquímica e não fotoquímica e taxa aparente de transporte de elétrons) de plantas de dois genótipos de feijão sob condições de salinidade;
- Averiguar as alterações na atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, peroxidase do ascorbato e peroxidase do guaiacol) e na peroxidação de lipídeos de membranas das folhas de plantas de feijão submetidas ao estresse salino;
- Determinar os teores dos Na⁺ e K⁺ nos tecidos das plantas de feijão, genótipos Pitiúba e TVU, sob condições de salinidade.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Feijão-caupi

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) é uma leguminosa pertencente à família *Fabaceae*, também conhecido como feijão-de-corda, feijão-verde, fradinho ou macassar. É uma cultura originária do continente africano, com sua introdução no Brasil em meados do século XVII pelos colonizadores portugueses, inicialmente no Estado da Bahia (FREIRE FILHO *et al.*, 2011). Possui genoma com um tamanho estimado de 695 Mb (NCBI, 2017), apresentando alto grau de colateralização com outras leguminosas, como por exemplo com *Phaseolus vulgaris* (MUÑOZ-AMATRIAÍN *et al.*, 2017).

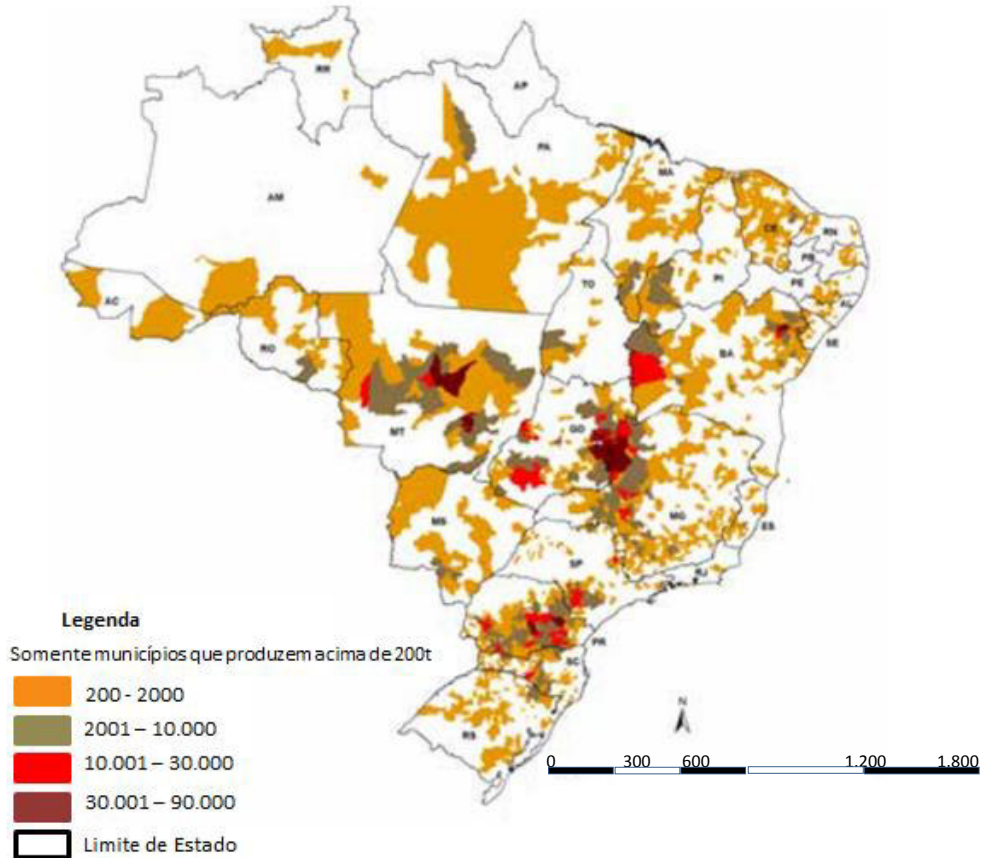
A produção desse grão é bastante difundida em todo o território nacional, sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial, atrás apenas de Myanmar e Índia (CONAB, 2016). China, Estados Unidos e México completam o grupo dos seis maiores produtores mundiais, responsáveis por 61% do total do feijão produzido no planeta (CONAB, 2016). No Brasil, o cultivo do feijão é realizado em três épocas distintas, dependendo das condições ambientais (COELHO *et al.*, 2016). Segundo estimativas da CONAB, considerando as três safras, a estimativa da produção nacional de feijão em 2017 é de 3.418,3 mil toneladas, um aumento de 36% em relação ao ano de 2016 (CONAB, 2017). A área total cultivada será de 3.179,8 mil hectares, um incremento de 12,1% em relação à safra passada, sendo 1.446,8 mil hectares com feijão-comum cores, 323,7 mil hectares com feijão-comum preto e 1.409,3 mil hectares com feijão-caupi. (CONAB, 2017). O Estado do Paraná é o maior produtor nacional, seguido por Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso. No Nordeste, a Bahia é o maior produtor (quinto nacional), com destaque também para os Estados do Ceará, Piauí e Maranhão (CONAB, 2016) (**Figura 1**).

O feijão é um dos grãos mais consumidos nos continentes africano, asiático e europeu (SINGH, 2005; TIMKO *et al.*, 2007), sendo o principal alimento proteico (23 a 25% de proteína) e energético (cerca de 62% de carboidratos) de comunidades rurais, bastante empregado no cultivo de subsistência (FREIRE FILHO *et al.*, 2011; NEVES *et al.*, 2011). Além do uso para consumo humano, o feijão é também empregado na alimentação animal, como forragem verde, feno, ensilagem, farinha, bem como na adubação verde e proteção do solo (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

Por ser de fácil manejo, com ciclo de desenvolvimento rápido, possuir baixa exigência nutricional e ter boa capacidade de adaptação a diferentes tipos de solo, o feijão

adaptou-se bem as condições do semi-árido, representando uma das culturas de maior importância econômica e nutricional nessas regiões.

Figura1. Mapa de distribuição do plantio de feijão-caupi em território brasileiro.



Fonte: CONAB, 2017.

É uma glicófita considerada moderadamente tolerante ao estresse salino (DANTAS *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2003), com capacidade de suportar níveis de salinidade de aproximadamente 4,9 dS/m (FAGERIA *et al.*, 2010).

Diversos centros de pesquisa investigaram os efeitos da salinidade em plantas de feijão-caupi, incluindo desde a germinação de sementes (GOGILE *et al.*, 2013), a floração (FURTADO *et al.*, 2014), o crescimento e desenvolvimento de plântulas (DE SOUSA *et al.*, 2010), o desbalanço nutricional (NEVES *et al.*, 2009), as trocas gasosas (PRAXEDES *et al.*, 2010), a fotossíntese (SOUZA *et al.*, 2011) e a modulação do proteoma (ABREU *et al.*, 2014). Contudo, ainda não existem estudos que relacionem as respostas fisiológicas e bioquímicas com a modulação da expressão de genes durante as respostas de aclimação ao estresse salino de plantas de feijão (*V. unguiculata*).

3.2 Estresse salino e seus efeitos sobre as plantas

A salinidade é um dos principais estresses abióticos que reduzem o crescimento e desenvolvimento de várias espécies, limitando significativamente a produção (ACOSTA-MOTOS *et al.*, 2017). Em escala mundial, mais de 800 milhões de hectares (ha) são atualmente afetados por altas concentrações de sal, o que corresponde a cerca de 6 % da área cultivada (FAO, 2015).

A salinização dos solos está associada às altas concentrações de NaCl, juntamente com outros sais minerais, tais como os cátions Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ e os ânions Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} e HCO_3^{2-} , ocorrendo principalmente em regiões áridas e semi-áridas do mundo. A salinidade do solo é muitas vezes medida em termos de condutividade elétrica (EC) e expressa como mS/m para baixa salinidade ou dS/m para alta salinidade, com base no princípio de que a solução salina alta faz com que mais eletricidade se mova através dela. Um solo é considerado salino quando apresenta condutividade elétrica maior do que 4 dS/m, o que equivale a aproximadamente 40 mM de NaCl (MUNNS; GILLIHAM, 2015).

Embora ocorra de forma natural (avanço da água do mar, intemperismo de rochas e minerais e deposição de materiais oceânicos), o processo de salinização do solo pode também ser acelerado pela influência humana em função de práticas inadequadas, como a irrigação com água de baixa qualidade e drenagem deficiente (HAKEEM; AKHTAR; SABIR, 2016).

No Brasil, os solos salinos ocupam cerca de 2% do território nacional, podendo ser encontrados principalmente na região Nordeste, onde o percentual de terras salinizadas chega a 25%, devido a uma elevada evapotranspiração e baixa precipitação pluviométrica no decorrer do ano, o que restringe a lixiviação e o transporte de sais (FAO, 2015; GORGI *et al.*, 2015).

Nas plantas, os efeitos prejudiciais do excesso de sais são decorrentes de fatores osmóticos e iônicos. Na fase osmótica, nos estágios iniciais da exposição das plantas à salinidade, elevados níveis de sais no solo induzem um desequilíbrio no potencial hídrico entre as células das raízes e a solução do solo, resultando na desidratação celular. Nesta fase, os efeitos osmóticos da salinidade afetam o status hídrico dos vegetais e causam fechamento estomático e inibição da expansão foliar (MUNNS; GILLIHAM, 2015; ACOSTA-MOTOS *et al.*, 2017). A redução no potencial de água fora das raízes leva a uma redução na transpiração e na concentração interna de CO_2 , resultando em diminuição da fotossíntese e na assimilação de carbono. Esse efeito pode produzir a cessação rápida do crescimento, mesmo após apenas algumas horas de exposição ao sal (ACOSTA-MOTOS *et al.*, 2017).

O fechamento estomático e o acúmulo de altos níveis de Na^+ tóxico no citosol em condições salinas prejudicam a maquinaria fotossintética e reduzem a capacidade da planta para utilizar plenamente a luz absorvida por pigmentos fotossintéticos. Isso leva à formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) em tecidos verdes com efeito tóxico nas estruturas biológicas (estresse oxidativo) (YOU; CHAN, 2015). Em excesso, as EROs são altamente reativas e podem alterar o metabolismo celular, atuando, por exemplo, na inativação de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos, além de desestruturar as membranas celulares (YOU; CHAN, 2015, HOSSAIN; DIETZ, 2016).

A fase iônica, por sua vez, se desenvolve após o efeito osmótico, quando íons tóxicos (como o Na^+) se acumulam em excesso nas plantas, em especial nas folhas (NEGRÃO *et al.*, 2017). O acúmulo excessivo de Na^+ pode afetar drasticamente a nutrição e o metabolismo, especialmente a absorção do K^+ e seu papel como cofator na atividade de enzimas (ALMEIDA *et al.*, 2017). Embora taxas fotossintéticas reduzidas ocorram inicialmente devido ao fechamento estomático, à medida que o estresse salino se torna mais grave o processo fotossintético é alterado devido à acumulação de sais em folhas jovens e à diminuição das concentrações de clorofila e carotenóides (MUNNS; TESTER, 2008; CHAVES *et al.*, 2009, WANG *et al.*, 2017).

A taxa de fotossíntese pode reduzir devido a outras limitações não estomáticas, como o distúrbio do transporte de elétrons e/ou a inibição das enzimas do ciclo de Calvin, como a rubisco (MUNNS; TESTER, 2008). Além disso, ocorrem reduções em parâmetros do quenching fotoquímico (F_v/F_m e qP) e na cadeia transportadora de elétrons (ETR). Por outro lado, há um aumento no quenching não fotoquímico (NPQ), como mecanismo de dissipação do excesso de energia e minimização da produção de EROs (LAMBREV *et al.*, 2012, TIEZ *et al.*, 2017).

De maneira geral, durante a exposição de plantas ao estresse salino todos os principais processos da planta são afetados, como a germinação, o crescimento, a fotossíntese, a respiração, a síntese proteica, as relações hídricas e as reações enzimáticas (PARIHAR *et al.*, 2015; PANDEY *et al.*, 2016; MISHRA; TANNA, 2017). Em conjunto, tais efeitos limitam o crescimento e desenvolvimento, podendo, inclusive, causar a morte das plantas (NEGRÃO *et al.*, 2017). Contudo, o grau com que a salinidade afeta os vegetais depende de muitos fatores, como espécie da planta, genótipo, idade, composição da solução salina, órgão afetado, além da severidade e duração do estresse (CRAMER *et al.*, 2011).

3.3 Tolerância de plantas ao estresse salino

Uma planta é tolerante à salinidade quando possui a habilidade de crescer e completar seu ciclo de vida em um substrato que contém altas concentrações de sais solúveis (PARIDA *et al.*, 2016). Baseado na capacidade de sobreviver em ambientes salinos, as plantas podem ser classificadas em halófitas (que são capazes de crescer em solos com concentrações de NaCl de até 300-400 mM) e glicófitas (têm seu crescimento inibido em concentrações da ordem de 100-200 mM de NaCl), sendo que as últimas correspondem à grande maioria das culturas de interesse econômico (DEINLEIN *et al.*, 2014; ROY *et al.*, 2014).

As respostas das plantas à salinidade são complexas, pois envolvem desde eventos aclimatativos de alterações no crescimento e desenvolvimento à ativação de mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares (ROY *et al.*, 2014; VIGHI *et al.*, 2017). Tais mecanismos incluem eventos como a percepção e transdução do sinal, regulação da transcrição, a osmoregulação e o ajuste osmótico, a homeostase de íons, a regulação hormonal e a ativação do sistema de defesa antioxidante, (GUPTA *et al.*, 2014; PANDEY *et al.*, 2016; MUCHATE *et al.*, 2016).

3.3.1 Mecanismos fisiológicos e bioquímicos

3.3.1.1 Homeostase osmótica e iônica

Quando as plantas são expostas a um ambiente salino respondem ativamente ao estresse reprogramando todo o metabolismo do crescimento e desenvolvimento para a indução de uma maior tolerância ao estresse (NEGRÃO *et al.*, 2017). Apresentam inicialmente respostas que envolvem a redução no surgimento e na expansão de novas folhas, e menor crescimento da planta, que são consideradas como mecanismos adaptativos do estresse osmótico da salinidade em concentrações baixas a moderadas (ACOSTA-MOTOS *et al.*, 2017).

Os mecanismos de tolerância ao componente osmótico do estresse salino são ativados imediatamente após a exposição ao estresse (NEGRÃO *et al.*, 2017). Nessa ocasião, as plantas acumulam osmólitos (os solutos compatíveis) no citosol e íons nos vacúolos, com o objetivo de baixar o potencial osmótico das células e favorecer a absorção de água (AHMAD *et al.*, 2016). Dentre os solutos compatíveis, destacam-se a prolina, glicina betaína, trealose, além de compostos nitrogenados, açúcares e polióis; os quais atuam como osmoprotetores contra desidratação ou desnaturação protéica (FLOWERS; COLMER, 2015).

Na maioria das espécies glicófitas, o acúmulo excessivo de íons tóxicos (em especial o Na^+) é o principal fator responsável pelos efeitos deletérios do estresse salino. Com a exposição prolongada ao estresse, o excesso de sais nos solos resulta na alta absorção de íons tóxicos pelas raízes e, conseqüentemente, na translocação e o acúmulo nos tecidos foliares (FLOWERS *et al.*, 2015). Além disso, sob condições de estresse, a homeostase iônica envolvendo os íons K^+ e Na^+ é comprometida severamente, pois o Na^+ compete antagonisticamente com o K^+ tanto pelos transportadores presentes nas raízes como pelo sítio ativo das enzimas dependentes de K^+ (ASSAHA *et al.*, 2017, ALMEIDA *et al.*, 2017).

A redução do acúmulo de Na^+ no citosol pode ser alcançada por sua exclusão da célula via antiporte SOS1 Na^+/H^+ de membrana plasmática (MIRANDA *et al.*, 2017a), bem como pela compartimentalização dele nos vacúolos através da atividade do antiporte NHX Na^+/H^+ (HASEGAWA, 2013, MISHRA *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2015, PENG *et al.*, 2016, HUANG *et al.*, 2017). Outras proteínas de transporte, como aquelas da família de transportadores de potássio de alta afinidade (HKT) podem atuar simultaneamente na regulação do transporte de Na^+ pelo xilema ou na recirculação das folhas para as raízes das plantas (HAUSER; HORIE, 2010; HAMAMOTO *et al.*, 2014, ASSAHA *et al.*, 2015). A atividade dessas proteínas de transporte envolve o controle restrito de diversas vias de sinalização, além da participação de bombas de prótons presentes no tonoplasto [H^+ -ATPase (V-ATPase) e H^+ -pirofosfatase (V-PPase)] e na membrana plasmática [H^+ -ATPase (P-ATPase)].

Estudos recentes têm mostrado que a tolerância ao estresse salino depende da capacidade da planta de controlar a entrada de Na^+ nas células, bem como regular efetivamente sua alocação e partição para compartimentos celulares ou tecidos. Evidências disso foram encontradas em plantas de sorgo (MIRANDA *et al.*, 2017a), milho (TOUNSI *et al.*, 2017), arroz (MISHRA *et al.*, 2016), feijão (SOBREIRA *et al.*, 2014), tomate (ALMEIDA *et al.*, 2014), *Arabidopsis* (NIEVES-CORDONES *et al.*, 2016), dentre outras.

3.3.1.2 Defesa antioxidante

Sob estresse salino várias EROs como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxil (HO^{\cdot}) são gerados quando elétrons escapam das cadeias de transporte de elétrons nas mitocôndrias e cloroplastos e reagem com O_2 na ausência de outros aceptores (CHOUDHURY *et al.*, 2017). Estas EROs afetam os componentes celulares, a membrana lipídica, proteínas e ácidos nucleicos, causando danos celulares oxidativos. Tanto

a produção de EROS como as enzimas de eliminação são encontradas em diferentes organelas de plantas como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (VERMA; RAVINDRAN; KUMAR, 2016). Para reduzirem os efeitos nocivos da produção de EROs as plantas desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante, que incluem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (HOSSAIN *et al.*, 2016).

Dentre as enzimas antioxidantes estão a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPX), a glutathione S-transferases (GST), a peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase de guaiacol (GPOD), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutathione redutase (GR), e mono dehydro ascorbato redutase (MDHAR); enquanto os antioxidantes não enzimáticos incluem ascorbato, glutathione, flavonoides, carotenoides e tocoferóis (GUPTA *et al.*, 2014, PARIDA *et al.*, 2016, NEGRÃO *et al.*, 2017). Tais componentes atuam de forma coordenada para manter um equilíbrio entre a taxa de formação e eliminação de EROS e garantir a continuidade dos processos metabólicos (YOU; CHAN, 2015).

Recentemente, a ativação efetiva do sistema de defesa antioxidante foi considerada crucial para a maior tolerância à salinidade de plantas de milho (GONDIM *et al.*, 2011, NANDHINI *et al.*, 2017), pinhão-mansão (GADELHA *et al.*, 2017) e arroz (VIGHI *et al.*, 2017).

3.3.1.3 Regulação hormonal

Os hormônios das plantas são integradores centrais do crescimento e desenvolvimento e são capazes de controlar a interação entre plantas e ambientes, incluindo as respostas das plantas ao estresse salino (URANO *et al.*, 2017).

Os principais hormônios vegetais incluem auxinas, citocininas e giberelinas (GA) (promotores de crescimento), etileno (ET) e ABA (retardadores de crescimento) (FUJITA *et al.*, 2011). A regulação de auxina modifica a arquitetura da raiz por melhorar a absorção de água do solo. Etileno e giberelina (GA) contribuem para a inibição do crescimento sob leve stress de desidratação. Citocininas regulam negativamente a sinalização de tensão de desidratação e a senescência. Ácido Jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA) possuem regulação positiva e negativa durante as respostas ao estresse e exibem algumas associações com ABA (HUANG *et al.*, 2012, RYU; CHO, 2015).

As respostas das plantas a estresses abióticos são controladas principalmente pelo ácido abscísico (ABA). Ele é um fitohormônio que atua na ativação de genes envolvidos no

ajustamento osmótico, compartimentação de íons, regulação do crescimento de folhas e raízes e modificações na condutividade hidráulica de raízes (AGARWAL; JHA, 2010, DUAN *et al.*, 2013). O déficit hídrico provoca a acidificação do simplasto de folha e alcalinização do apoplasto - ambos os mecanismos aumentam a acumulação de ABA no apoplasto de folhas - levando ao aumento de ABA, chegando às células de guarda para iniciar o fechamento em resposta ao déficit hídrico. O aumento da concentração de ABA nas folhas e outros tecidos não só afeta oscilações estomáticas como também confere adaptação ao sal por ajuste osmótico e pela síntese de certas proteínas de estresse envolvidas na tolerância ao sal, (TUTEJA *et al.*, 2007, BASU; RABARA, 2017). A expressão ABA dependente envolve elementos de ação *cis* da família ABRE (do inglês, ABA-responsive elements) (HUANG *et al.*, 2012).

A expressão de genes responsivos a ABA é diretamente regulada por fatores de transcrição (FTs), que reconhecem e se ligam a elementos-*cis* nas regiões do promotor dos seus genes alvo. Os genes responsivos ao estresse podem ser expressos através de uma via dependente de ABA ou independente de ABA (BASU; RABARA, 2017). Estudos genéticos indicam que não existe uma linha clara de demarcação entre vias independentes dependentes de ABA e os componentes envolvidos podem freqüentemente convergem para uma mesma via de sinalização (VISHWARKARMA *et al.*, 2017). Além dos FTs, a expressão de genes mediada por ABA é controlada por receptores, mensageiros secundários, cascatas de proteína quinase / fosfatase, e fatores de remodelação de cromatina (KUNDU; GANTATIT, 2017).

3.3.2 Mecanismos moleculares durante a aclimação ao estresse

Quando uma planta é submetida ao estresse, vários genes são ativados ou reprimidos simultaneamente, resultando em variações nos níveis de metabólitos e proteínas, alguns dos quais são determinantes para conferir certo grau de proteção a esse estresse (BAHMANI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016). Os genes ativados atuam não somente na regulação da expressão gênica, mas também na transdução do sinal de resposta ao estresse (GECHEV, HILLE, 2012, BAHMANI *et al.*, 2015).

As respostas moleculares das plantas ao estresse salino envolvem a participação de inúmeros processos metabólicos, como aqueles voltados para o controle da homeostase iônica, indução de compostos antioxidantes e de diversos produtos proteicos que atuam nas respostas de defesa. (SHUKLA *et al.*, 2017). Assim, partindo do princípio que a tolerância à salinidade é um processo de natureza multigênica, a identificação de genes envolvidos nas

respostas ao excesso de sais é de fundamental importância para melhorar o entendimento dos mecanismos de tolerância das plantas e possibilitar um aumento na produtividade.

Após a percepção do sinal primário por vários sensores primários, os sinais secundários iniciam uma cascata de eventos de sinalização (SEWELAM *et al.*, 2016). Os eventos iniciais de sinalização incluem, entre outros, a alteração da concentração citoplasmática livre de Ca^{2+} , a produção de moléculas de sinalização secundária, como espécies reativas de oxigênio (EROS), formas de nitrogênio reativo (FNR) e ácido abscísico (ABA). Eles ativam a cascata MAPK, proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs), proteínas quinases dependentes de cálcio / calmodulina (CCaMKs) e fosfatases que, por sua vez, podem fosforilar / desfosforilar proteínas específicas e, finalmente, iniciar a ativação de diferentes fatores de transcrição.

Fatores de transcrição (TFs) são ferramentas genéticas importantes no desenvolvimento de culturas tolerantes ao estresse em virtude de seus papéis únicos na modulação de diferentes genes que respondem ao estresse (SEO; CHOI, 2015). Estes TFs incluem um grande número de famílias, como AP2 / ERF, bZIP, NAC, MYB e WRKY, que exibem maiores correlações com a salinidade (KUMAR *et al.*, 2017). Alguns destes TFs seguem a via de transdução de sinal dependente de ABA, enquanto outros são independentes dela (SEO; CHOI, 2017; YANG *et al.*, 2017). Além disso, a modulação na expressão de genes alvo também depende da regulação pós-transcricional de TFs que controlam estritamente a expressão de um respectivo gene. Neste processo, os TFs desempenham um papel crucial na transdução do sinal e interagem com sequências reguladoras *cis*, modulando assim a expressão de uma série de genes envolvidos em diferentes estresses abióticos (AGARWAL; JHA, 2010; KUMAR *et al.*, 2017).

Diversos estudos têm reportado o papel dos fatores de transcrição durante a aclimação de plantas ao estresse salino, os quais podem estar envolvidos em vias dependentes ou independentes de ABA. Essa ideia tem sido apoiada pelas pesquisas recentes com os fatores WRKY e NAC em plantas de crisântemo (LIANG *et al.*, 2017), algodão (LIU *et al.*, 2014), arroz (HONG *et al.*, 2016) e soja (CAO *et al.*, 2017). Tais respostas estão sob um controle restrito e dependem do tipo e intensidade da regulação, as quais são mediadas principalmente por hormônios (ABA, AIA, JA, ET e CK).

Além das vias citadas anteriormente, genes envolvidos na homeostase iônica constituem componentes importantes nos mecanismos moleculares de resposta ao estresse. Dentre eles, destacam-se aqueles que codificam para bomba de prótons, transportadores do

tipo antiporte Na^+/H^+ (NHX e SOS1), transportadores de potássio de alta afinidade, canais de cálcio, transportadores SKC1, além de moléculas de sinalização e transdução de sinais (SOBREIRA *et al.*, 2014; PRISCO; GOMES-FILHO; MIRANDA, 2016; MIRANDA *et al.*, 2017a; MIRANDA *et al.*, 2017b; REDDY *et al.*, 2017).

3.4 Genômica funcional: abordagem transcriptômica

As publicações dos genomas de *Arabidopsis thaliana* no ano 2000 e de *Oryza sativa* em 2005 revolucionaram a pesquisa genômica vegetal, possibilitando uma maior compreensão da biologia de plantas em espécies modelos, através do sequenciamento de genomas inteiros, resequenciamento com genoma alvo, análises de transcriptomas e epigenomas aliada ao avanço concomitante das análises de bioinformática (MOROZOVA; MARRA 2008; GAPPER *et al.*, 2014).

Na era pós-genômica, um avanço significativo para o progresso das ciências foi o surgimento das "ômicas", com base em abordagens como transcriptômica, proteômica e metabolômica em vários organismos modelo (DENG *et al.*, 2016). Essas abordagens estabeleceram as bases para a Genômica Funcional, bem como proporcionaram uma visão ampla dos processos metabólicos envolvidos nas regulações tradicionais que são ativadas em resposta a um estímulo específico (PANDEY, 2015). Convém salientar que a bioinformática desempenha um papel central na análise e no gerenciamento dessa enorme quantidade de dados gerados pelas ciências ômicas, contribuindo para a compreensão adicional da função das moléculas biológicas em diferentes níveis (DENG *et al.*, 2016).

Na última década, o emprego de tecnologias de seqüenciamento de nova geração, também conhecidas como NGS (do inglês, *Next Generation Sequencing*), passou a substituir o seqüenciamento de Sanger como método de seqüenciamento do genoma (MARDIS, 2008). A técnica de NGS permitiu a produção de dados de seqüenciamentos de genomas e transcriptomas em larga escala, com um custo muito menor, chegando a produzir até 600.000 vezes mais informações por corrida que o método de Sanger (LIU *et al.*, 2012). Essa vantagem operacional permitiu um aumento exponencial do volume de projetos de genômica estrutural e funcional em todo o mundo, tornando viável o seqüenciamento de genomas de espécies modelos e não modelos (LEVY; MEYERS, 2016). Como pontos negativos das tecnologias NGS tem-se o pequeno tamanho dos fragmentos (reads) seqüenciados e uma quantidade maior de erros do que o método Sanger (MARDIS, 2013).

As primeiras plataformas de sequenciamento NGS de segunda geração foram disponibilizadas em 2005, tendo como atrativo a possibilidade sequenciar as moléculas de interesse em um processo mais rápido, barato e acessível. A primeira plataforma comercializada foi a 454 (Roche Applied Science), que realiza o sequenciamento baseado em síntese, por uma técnica conhecida como pirosequenciamento. Com o passar dos anos, novas plataformas foram disponibilizadas, destacando-se a Genome Analyser IIx (Illumina, Inc.), SOLiD (Applied Biosystems) e HiSeq (Illumina, Inc.), sendo esta última a mais utilizada em experimentos de sequenciamento de RNA (RNA-seq) (GLENN *et al.*, 2011, ANSORGE, 2016).

A plataforma Illumina foi lançada em 2006 e prontamente aceita em virtude de seu desempenho em relação às plataformas existentes, contendo uma taxa de erro menor do que 2%, o que a tornou um dos principais métodos de análises de transcriptomas. O sequenciamento realizado na plataforma Illumina depende de uma biblioteca de adaptadores anexada a uma superfície, chamada estação de cluster. Os fragmentos são amplificados em um processo conhecido com amplificação de ponte, que usa DNA polimerase para sintetizar cópias dos fragmentos de DNA. Cada conjunto de cópias de fragmento (ou bibliotecas de cDNA) contém aproximadamente um milhão de cópias do fragmento original. A metodologia empregada na plataforma Illumina é bastante semelhante àquela utilizada no sequenciamento de Sanger, porém, com rendimento muito superior (LIU *et al.*, 2012).

Mais recentemente foram desenvolvidas as plataformas de terceira geração, tais como a Pac Bio (Pacific Bioscience) e a *Nanopore* (Oxford Nanopore Technologies (LEVY; MEYERS, 2016). O sequenciamento de terceira geração possibilita maior acurácia nas análises, pois tem o potencial de eliminar os erros de sequenciamento de DNA durante a fase de amplificação (ATIHA; SAEED, 2016).

Com o advento dos métodos baseados em sequenciamento de alto rendimento, a forma como os transcriptomas são estudados mudou, aumentando a compreensão das respostas de plantas à fatores externos (WANG *et al.* 2009; MARTIN; WANG, 2011). A primeira técnica de transcriptômica de larga escala utilizada foi a de microarranjos. Diversos centros de pesquisas ainda empregam essa técnica para o estudo do transcriptoma de plantas submetidas a estresses abióticos (SHAM *et al.*, 2015; HOSSAIN *et al.*, 2016). Contudo, em função dessa tecnologia ser baseada na hibridização, a análise transcriptômica é restrita aos genes conhecidos, não sendo possível identificar novos transcritos, além de não fornecer informação da sequência e necessitar de grande quantidade de RNA (ZHAO *et al.*, 2014).

A técnica de sequenciamento de RNA (RNA-seq) tornou-se uma ferramenta útil para a análise acurada dos perfis de transcriptomas, fornecendo uma visão mais precisa de genes relacionados a estresses abióticos (GRABHERR *et al.*, 2011). Ela envolve o sequenciamento direto de DNAs complementares (cDNAs) usando tecnologias de sequenciação de DNA de alto rendimento, seguido do mapeamento das leituras de seqüências para o genoma (WOLF *et al.*, 2013).

A montagem dos dados de transcriptoma é realizada usando uma de três abordagens: genomas de referência, montagem *de novo* ou a combinação de ambos. Através da técnica de RNA-seq, os fragmentos de RNA são geralmente convertidos em cDNA e, em seguida, são ligados a adaptadores em ambas as extremidades. Cada molécula de cDNA é amplificada para ser, então, sequenciada em uma extremidade (single-end) ou em ambas as extremidades (paired-end). Cada sequencia gerada pode ter o tamanho de 35 a 400 pb (chamadas *reads*), dependendo da plataforma utilizada. Após o sequenciamento, as *reads* resultantes podem ser alinhadas a um genoma de referência ou podem ser usadas para realizar uma montagem *de novo* do transcriptoma. O alinhamento das seqüências em um genoma de referência permite o mapeamento da estrutura e estimativa dos níveis de expressão de cada gene (MARTIN; WANG, 2011).

Recentemente, a análise transcriptômica tem constituído uma das ferramentas mais empregadas nos estudos voltados para a elucidação das rotas de defesa de plantas a diferentes estresses, como exemplo as pesquisas com *Arabidopsis thaliana* (ZHANG *et al.*, 2017), arroz (CHEN *et al.*, 2017), milho (LI *et al.*, 2017), trigo (XIONG *et al.*, 2017), algodão (WEI *et al.*, 2017), soja (SONG *et al.*, 2016) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) (HIZ *et al.*, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Experimento 1 – Modulação do transcriptoma de plantas de *Vigna unguiculata* sob condições de estresse salino

Durante essa etapa, os experimentos foram conduzidos com o objetivo de identificar mecanismos moleculares envolvidos nas respostas de plantas de *V. unguiculata* ao estresse salino. Para isso, foi analisado o perfil transcriptômico das plantas dos genótipos Pitiúba e TVU. Os experimentos foram conduzidos de modo idêntico ao descrito no item 4.1.1 e 4.1.2. As coletas foram realizadas após 1 e 8 dias da imposição do estresse salino, com 3 repetições para cada tratamento.

4.1.1 Extração do RNA total

Para a análise transcriptômica foram coletadas as três primeiras folhas mais jovens completamente expandidas. Durante as coletas, o material vegetal foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até extração do RNA total. O procedimento de extração do RNA total foi realizado utilizando o "kit" "NucleoSpin RNA Plant" (MACHEREY-NAGEL), de acordo com as recomendações do fabricante. Para eliminar contaminações com DNA, as amostras foram tratadas com a enzima DNase (MACHEREY-NAGEL).

4.1.2 Quantificação e pureza do RNA

A quantificação do RNA total foi realizada por meio de leituras espectrofotométricas a 260nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Já a pureza do RNA foi estimada pela análise da razão das leituras de absorvância 260/280 e 260/230 nm, buscando identificar contaminações por proteínas (razão deve estar entre 1,8 a 2) e polissacarídeos (razão deve estar acima de 2), respectivamente. A qualidade do RNA total foi também avaliada em eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Nessa ocasião, a integridade do RNA ribossomal (18S e 28S) foi visualizada em transiluminador de luz UV, sendo o RNA fotodocumentado por meio do sistema Mini BIS Pro (Bio-Imaging Systems) com auxílio do software GEICaptureTM. A acurácia da quantidade e qualidade do RNA para sequenciamento foi confirmada através do Bioanalyzer (Agilent 2100), um equipamento que atribui valores de 1 a 10 para o nível de integridade do RNA (RIN) (amostras com valores RIN > 7 são consideradas de boa qualidade) (SCHROEDER, *et al.*, 2006).

4.1.3 Análise Transcriptômica via Sequenciamento do RNA (RNA-seq)

4.1.3.1 Construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento.

O perfil transcriptômico das folhas de plantas de feijão sob estresse salino foi analisado empregando a técnica de sequenciamento de RNA (RNA-seq) via Illumina HiSeq2000. O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa CD Genomics (Shirley, NY, EUA), o que resultou na confecção de 8 bibliotecas correspondentes a dois tempos de estresse (1 e 8 dias) dos seguintes tratamentos: Pitiúba controle (PC), Pitiúba salino (PS), TVU controle (TC) e TVU salino (TS).

O RNA foi purificado a partir de 1 µg de RNA total, utilizando sondas biotinizadas que se ligam seletivamente aos RNAs ribossômicos e que estão presentes no *Kit TruSeq Stranded Total RNA with Ribo – zero Plant* (Illumina, San Diego, CA, USA). O RNA selecionado foi então fragmentado na presença de tampão de fragmentação 5X (contendo cátions divalentes) e submetido a 94 °C por 5 minutos. Posteriormente, a dupla fita de cDNA foi sintetizada usando primers randômicos (N6) e o kit SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis (Invitrogen). Em seguida, adaptadores presentes no kit da Illumina “*TruSeq RNA-seq Sample Preparation v2*” foram ligados em ambas as extremidades dos fragmentos de cDNA para amplificação e sequenciamento do cDNA. Os fragmentos de 300 a 400pb (pares de bases), correspondentes ao cDNA ligado aos adaptadores, foram separados dos adaptadores não ligados através de eletroforese em gel de agarose a 2 %.

A qualidade das bibliotecas foi estimada usando o Bioanalyzer 2100 (*Agilent Technologies*) com o uso do *kit Agilent DNA 1000 (Agilent Technologies)*. Em seguida, as bibliotecas foram enriquecidas através de 15 ciclos de PCR de ponte em fase sólida e sequenciadas através da plataforma *Illumina HiSeq2000* usando o *Kit Truseq SBS (v 3)* (Illumina, San Diego, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado a partir da técnica de sequenciamento em ambas as extremidades (paired-end), com fragmentos de 2 × 150 pares de bases.

4.1.3.2 Análises de Bioinformática

4.1.3.2.1 Processamento dos dados (sequências) e montagem de transcritos

As sequências obtidas do sequenciamento (*reads*) foram inicialmente analisadas e avaliadas qualitativamente. Nessa ocasião, as sequências dos adaptadores e aquelas de baixa qualidade (*Phred score* < 20) foram removidas usando o programa Trimmomatic v. 0.32

(BOLGER *et al.*, 2014); ao passo que a qualidade dos *reads* (qualidade de cada base nucleotídica, tamanho da maioria dos reads, porcentagem de GC) foi avaliada pelo programa FastQC (ANDREWS, 2010). Apenas *reads* com alta qualidade foram utilizadas nos ensaios posteriores.

No presente estudo, houve dificuldade para proceder a montagem dos transcritos utilizando os bancos de dados disponíveis, pois o genoma de referência (*V. unguiculata*) apresentava-se com baixa qualidade de montagem e baixa cobertura, o que não permitiu uma anotação precisa/ideal para as análises de transcriptômica. Assim, foi conduzida uma montagem *de novo* dos *reads*, para gerar transcritos, usando o programa Trinity v.2.4.0 (GRABHERR *et al.*, 2011). De modo geral, esse software analisa sobreposições nas extremidades dos *reads*, gerando *contigs* representativos de uma sequência parcial ou completa para um dado transcrito representativo do transcriptoma de *V. unguiculata*. Após montagem *de novo* dos *contigs*, os transcritos foram mapeados contra o transcriptoma de referência usando o programa Bowtie2 v2.3.2 (LANGMEAD *et al.*, 2013). A contagem dos transcritos de cada biblioteca foi estimada utilizando o programa RSEM versão 1.2.0 (LI; DEWEY, 2011).

4.1.3.2.2 Identificação e análise dos genes diferencialmente expressos (GDEs)

A identificação e as variações nos níveis de expressão dos genes diferencialmente expressos (GDEs) foram realizadas utilizando os arquivos de contagem dos transcritos e o programa R v3.2.3, que inclui o pacote estatístico *edgeR* (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010). Durante os ensaios *in silico*, foram considerados como GDEs apenas os transcritos cujo o \log_2 *fold-change* foi ≤ -1 ou ≥ 1 e com diferença estatística significativa (*False Discovery Rate* - FDR < 0,01). As comparações empregadas na inferência dos GDEs foram estabelecidas das seguintes maneiras: Pitiúba controle (PC) \times Pitiúba sal (PS), TVU controle (TC) \times TVU sal (TS) e TVU sal (TS) \times Pitiúba sal (PS), nos tempos 1 e 8 dias isoladamente. Por fim, os GDEs identificados em cada comparação foram usados para construção de diagramas de dispersão (*MA plots*) e diagramas de *Venn* utilizando o software *edgeR*.

4.1.3.2.3 Anotação dos genes diferencialmente expressos (GDEs) e ontologia gênica (GO)

A anotação gênica dos GDEs foi realizada utilizando a ferramenta BLASTx [(*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) (ALTSCHUL *et*

al., 1997)], por meio de buscas em bancos de dados de proteínas [*Non-redundant protein sequences* (nr), *Reference proteins* (refseq-protein) e *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)]. Para os transcritos ainda não caracterizados nos bancos de dados proteicos, foram feitas buscas adicionais no banco de dados de transcritos [*Expressed Sequence Tags* (ESTs) e *Reference RNA sequence* (Refseq-RNA)].

A classificação dos genes de acordo com a Ontologia Gênica (GO) foi feita com o auxílio da ferramenta *BLAST2GO* (CONESA; GOTZ 2008; GOTZ *et al.*, 2011). Nessa ocasião, os GDEs foram categorizados nos seguintes termos: componente celular, processo biológico e função molecular. Já a inferência das vias metabólicas que apresentaram GDEs foi realizada através do servidor *KAAS* [*KEGG Automatic Annotation Server*] (<http://www.genome.jp/tools/kaas/>), empregando o método *bidirectional best hit* (BBH) (MORIYA *et al.*, 2007; KANEHISA *et al.*, 2017). O *KAAS* possibilita a anotação funcional de genes por meio de um BLAST contra o banco de dados do *KEGG* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Os resultados fornecem o *KO* (*KEGG Orthology*), um identificador automatizado usado para identificar as propriedades funcionais e os papéis biológicos dos GDEs (MORIYA *et al.*, 2007).

4.2 Experimento 2 - Fisiologia e bioquímica da tolerância de plantas de *Vigna unguiculata* ao estresse salino.

Nessa etapa, os experimentos foram realizados com o objetivo de identificar as respostas fisiológicas e bioquímicas que resultam na tolerância diferencial ao estresse salino de plantas de *V. unguiculata*, genótipos Pitiúba e TVU. Para isso, foram analisados os parâmetros de crescimento (produção de biomassa), trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, pigmentos fotossintéticos, teores de íons inorgânicos, bem como a peroxidação de lipídeos e a atividade de enzimas antioxidantes. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e as análises foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará (UFC). As coletas foram realizadas após 8 e 16 dias da imposição do estresse salino, com 3 repetições para cada tratamento.

4.2.1 Material Vegetal e condições experimentais

Inicialmente, sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) dos genótipos Pitiúba e TVU 2331, disponibilizadas pelo banco de germoplasma do Departamento de Fitotecnia da UFC, foram embebidas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2,5%, por 5 minutos,

seguida de lavagem com água destilada. Posteriormente, as sementes foram imersas em água destilada por um período de 2h. As sementes foram colocadas para germinar sobre papel germitest, umedecido com água destilada, em recipientes plásticos. Os recipientes foram mantidos em câmara de germinação do tipo BOD, com fotoperíodo de 12/12h, temperaturas de 30 e 25°C durante o dia e a noite, respectivamente, por um período de 5 dias.

Após germinação, plântulas de tamanho uniforme foram selecionadas e transferidas para bacias plásticas contendo 10L de solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950) a 1/4 da força iônica, sob aeração constante, para um período de aclimatação em condições de casa de vegetação. Decorridos três dias, a solução nutritiva foi renovada e as plantas permaneceram por igual período em solução a 1/2 da força iônica. Por fim, as plantas foram novamente selecionadas com base no critério de uniformidade e transferidas para baldes de 6L (1 planta por vaso) contendo solução nutritiva com força iônica total, sendo feitas trocas periódicas a cada cinco dias para evitar deficiência nutricional das plantas (Figura 1).

Figura 2. Disposição e condições de cultivo de plantas de feijão-de-corda, *Vigna unguiculata*, nas dependências da casa de vegetação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da UFC.



Fonte: elaborado pelo autor.

A exposição das plantas ao estresse salino foi iniciada aos 14 dias após a germinação, com a aplicação de 2 doses de 50 mM de NaCl a cada doze horas até atingir a concentração final de 100 mM. Tal procedimento foi utilizado para evitar o choque osmótico nas raízes das plantas. Um grupo de plantas permaneceu em solução nutritiva sem a adição de NaCl,

constituindo o tratamento controle. No decorrer dos experimentos, as condições ambientais foram as seguintes: temperatura média de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e $25 \pm 1^\circ\text{C}$, durante o dia e a noite, respectivamente; e umidade relativa do ar média de $60 \pm 8\%$.

4.2.2 Coleta do material vegetal e parâmetros de crescimento

A coleta e análise do material vegetal foram realizadas em diferentes tempos. Para as análises de crescimento e os ensaios bioquímicos e fisiológicos, amostras de raízes, caules e folhas foram coletadas aos 8 e 16 dias após o início dos tratamentos de estresse salino, com 3 repetições para cada tratamento. Esse procedimento foi realizado para dois grupos de plantas, sempre no mesmo horário, entre 8h e 10h da manhã. No primeiro grupo, as plantas foram inicialmente separadas em seus órgãos constituintes, a área foliar (AF) foi mensurada utilizando-se um medidor de superfície LI-300 (Area Meter, Li-Cor., Inc., Lincoln, Nebraska, USA), e o material coletado foi armazenado a -20°C e, após o congelamento, liofilizado. Após secagem do material, as massas secas das folhas (MSF), caules (MSC) e das raízes (MSR) foram determinadas. Em seguida, o material vegetal foi macerado, com o auxílio de almofariz e pistilo, e o pó liofilizado foi utilizado para a determinação dos íons inorgânicos. Já no segundo grupo, parte do material fresco das folhas foi utilizada imediatamente para a determinação dos teores de clorofilas e carotenoides, enquanto a outra foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C para utilização nas análises enzimáticas e de peroxidação de lipídeos.

Para a análise transcriptômica foram coletadas as três primeiras folhas mais jovens completamente expandidas, após 1 e 8 dias da exposição aos tratamentos salinos, com 3 repetições para cada grupo. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a etapa de extração do RNA total. Vale ressaltar que os tempos (1 e 8 dias) foram selecionados com base no conhecimento que as respostas moleculares, incluindo a expressão gênica, antecedem as respostas bioquímicas e fisiológicas.

4.2.3 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a

Antecedendo cada coleta, as trocas gasosas (assimilação de CO_2 , transpiração e condutância estomática) e os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* {eficiência quântica potencial (F_m/F_v) e efetiva ($\Delta F/F_m'$) do fotossistema II, coeficientes de extinção fotoquímica [$qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$] e não fotoquímica [$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$] da fluorescência e a taxa aparente de transporte de elétrons ($ETR = \Delta F/F_m' \times PFD \times 0,5 \times 0,84$)} foram mensuradas

utilizando um analisador de gás no infravermelho (IRGA, Li-6400XT, Li-COR, NE, USA) com um fluorômetro acoplado (6400-40, Li-COR, NE, USA). A partir dos valores de assimilação de CO₂ e da concentração interna de CO₂ (C_i) foi calculada a eficiência de carboxilação da Rubisco, pela relação A/C_i. As análises foram mensuradas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 16 dias da imposição dos tratamentos de estresse.

4.2.4 Determinação de pigmentos fotossintéticos

Os teores de clorofila a (C_{lf_a}), b (C_{lf_b}) e total (C_{lf_{total}}) e de carotenoides foram determinados seguindo a metodologia descrita por Wellburn (1994). Três discos foliares (aproximadamente 0,050 g) foram excisados de folhas completamente expandidas, transferidos para recipientes contendo 3,0 mL da solução de extração (CaCO₃ saturado com DMSO), e mantidos ao abrigo da luz por 48h. Após esse período, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Os extratos foram submetidos a leituras de absorvância a 665, 649 e 480 nm, tendo como o branco a solução de extração. As concentrações de C_{lf_a}, C_{lf_b}, C_{lf_{total}} e de carotenoides foram calculadas utilizando as seguintes equações:

$$C_{lf_a} = 12,47 A_{665} - 3,62 A_{649}$$

$$C_{lf_b} = 25,06 A_{649} - 6,50 A_{665}$$

$$C_{lf_{total}} = 7,15 A_{665} + 18,71 A_{649}$$

$$Carotenoides = (1000 A_{480} - 1,29 C_{lf_a} - 53,78 C_{lf_b})/220$$

Os valores obtidos foram expressos em µg/g de massa seca.

4.2.5 Determinação dos teores de íons inorgânicos

Os extratos para determinação das concentrações dos íons Na⁺ e K⁺ foram obtidos a partir de tecidos de raízes, caules e folhas, de acordo com a metodologia descrita por Cataldo *et al.* (1975). Em tubos de ensaio, 100 mg do pó liofilizado foram homogeneizados com 5,0 mL de água deionizada. O homogenato foi incubado a 45 °C, por 1 hora, em banho-maria, com agitações a cada 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 × g, durante 10 minutos, e o sobrenadante (extrato) foi coletado, filtrado em papel de filtro e armazenado a -20°C até o momento da análise. Os teores de sódio e potássio foram determinados por fotometria de chama, segundo Malavolta *et al.* (1989). Cada extrato foi dosado em triplicata e os resultados foram expressos em µmol g⁻¹ MS.

4.2.6 Peroxidação de lipídeos de membrana e atividade de enzimas antioxidantes

4.2.6.1 Preparo dos extratos

Os extratos para a determinação da peroxidação de lipídeos e da atividade das enzimas antioxidantes foram obtidos a partir da maceração em nitrogênio líquido de 1 g de tecidos frescos de folhas com 4,0 mL de tampão Tris-HCl a 0,05M, pH 8,0, contendo EDTA a 0,1 mM. O homogenato foi centrifugado a $12,000 \times g$, durante 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado imediatamente ou armazenado a -20°C até posterior análise.

4.2.6.2 Peroxidação de lipídeos de membranas

A determinação da peroxidação de lipídeos de membranas foi realizada usando o teste para substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (CAKMAK; HORST, 1991), através da determinação dos teores do malondialdeído (MDA). O meio de reação, composto por 0,5 mL do extrato e 1,5 mL da solução de TBA a 0,5% em TCA a 20%, foi incubado em banho-maria a 90°C, por 20 minutos, sendo a reação interrompida por resfriamento em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $10.000 \times g$, por 5 minutos, e o sobrenadante coletado e submetido a leituras de absorvância a 532 nm e 600 nm. Os teores de MDA foram estimados pela subtração das leituras espectrofotométricas ($A_{532} - A_{600}$), utilizando o coeficiente de extinção molar ($155 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), sendo expressos em $\text{nmol MDA g}^{-1} \text{ MF}$.

4.2.6.3 Atividade das enzimas antioxidantes

4.2.6.3.1 Dismutase do superóxido

A atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) foi determinada de acordo com o método de Giannopolitis e Ries (1977). O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,8, EDTA a 0,1 mM, metionina a 19,5 mM, nitro cloreto de tetrazólio azul (NBT) a 75 μM , riboflavina a 2 μM e 50 μL do extrato bruto convenientemente diluído, em um volume final de 1,5 mL. A reação foi conduzida em uma câmara revestida internamente com papel alumínio e iluminada com duas lâmpadas fluorescentes de 20 W, por 15 min. A atividade da SOD foi estimada através do aumento da absorvância a 560 nm, devido à produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT. Os resultados foram expressos em $\text{UA mg}^{-1} \text{ prot}$, sendo UA (unidade de atividade enzimática) definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da fotorredução do NBT, no período de 15 min.

4.2.6.3.2 Catalase

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada de acordo com Havir e McHale (1987). O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio a 86 mM, pH 7,0, EDTA a 86 μ M, H₂O₂ a 20mM e 150 μ L do extrato bruto convenientemente diluído, em um volume final de 1,5 mL. A atividade enzimática foi determinada pelo decréscimo da absorbância a 240 nm, resultado da decomposição do H₂O₂, durante 1 min. Os resultados foram calculados usando o coeficiente de extinção molar (36 M⁻¹ cm⁻¹) e expressos em μ mol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ prot.

4.2.6.3.3. Peroxidase do ascorbato

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981). O meio reacional foi composto por uma mistura contendo tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 6,0, EDTA a 0,05 mM, ascorbato a 0,015 M, H₂O₂ a 0,03 M e 300 μ L do extrato enzimático convenientemente diluído, em um volume final de 1,5 mL. A atividade da APX foi estimada pela oxidação do ascorbato, mensurada pelo decréscimo de absorbância a 290 nm. Os resultados foram calculados usando o coeficiente de extinção molar do ascorbato ($\epsilon = 0,0028 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expressos em μ mol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ prot.

4.2.6.3.4 Peroxidase do guaiacol

A atividade da peroxidase do guaiacol (GPOD EC 1.11.1.9) foi determinada seguindo a metodologia descrita por Kar e Mishra (1976). A mistura de reação foi composta por 50 μ L do extrato convenientemente diluído, 950 μ L de tampão fosfato de potássio a 0,1M, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM, 500 μ L de guaiacol a 20 mM e 500 μ L de H₂O₂ a 60 mM. A atividade da GPX foi acompanhada pela formação do tetraguaiacol, monitorado pelo aumento da absorbância a 470 nm. Os resultados foram expressos em μ mol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína, usando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol ($\epsilon = 0,266 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.2.6.3.5 Teores de proteínas solúveis

O método de Bradford (1976) foi empregado para determinar a concentração de proteínas nos extratos enzimáticos. Os resultados obtidos (quantificação) foram utilizados nos

cálculos para determinação das atividades enzimáticas. A partir de 100 µL do extrato bruto, convenientemente diluído, foi adicionado 1,0 mL de uma solução de Coomassie Blue G-250. Em seguida a mistura foi deixada em repouso por 15 minutos e então submetida a leituras de absorvância a 595 nm. As concentrações das proteínas solúveis foram estimadas através de comparação com curva padrão, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

4.2.7 Delineamento Experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 × 2, consistindo de dois tratamentos salinos (ausência e presença de NaCl a 100 mM) e dois genótipos feijão-caupi (pitiúba e TVU 2331), com 3 repetições. Os dados obtidos nos ensaios fisiológicos, bioquímicos e de crescimento foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando houve diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o programa Sigma Plot v11.0 (SYSTAT Software, Inc.).

5 RESULTADOS

Plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), genótipos Pitiúba e TVU, foram utilizadas como modelo experimental para investigar os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos na tolerância ao estresse salino.

5.1 Análise transcriptômica

5.1.1 Extração e qualidade do RNA total

Os resultados de quantificação e análise do RNA das folhas de plantas de *V. unguiculata* demonstraram que as amostras apresentaram ótima qualidade, com valores de concentração entre 810,5 e 1695,8 ng/ μ L e relações $A_{260/280}$ entre 1,8 e 2,0 e $A_{260/230}$ maior que 2,0, sugerindo grau de pureza satisfatório para as análises moleculares em relação a contaminação por polissacarídeos, compostos fenólicos e proteínas (**dados não mostrados**).

A análise das amostras em gel de agarose a 1,5%, através da visualização das bandas 18S e 28S do RNA ribossomal, demonstrou que o RNA estava íntegro, evidenciando que o procedimento de extração do RNA total ocorreu de forma satisfatória e que não houve degradação das amostras. A qualidade das amostras de RNA foi também confirmada pela empresa *CD genomics*, pois os valores de RIN (RNA integrity number) foram superiores a 7 (**dados não mostrados**), caracterizando amostras com boa qualidade e aptas para o prosseguimento das etapas seguintes (construção das bibliotecas e sequenciamento).

5.1.2. Sequenciamento e montagem de transcritos

O sequenciamento das oito bibliotecas de cDNA utilizando a plataforma HiSeq 2000 da Illumina gerou um total de 55.900.530 *reads* com qualidade (**Tabela 1 e Figura 3**). O montante de *reads* das bibliotecas variou entre 6.476.103 a 7.499.225, com fragmentos apresentando comprimento médio de 126 pares de bases (pb).

No total, após montagem das 55.900,530 *reads*, foram gerados 150.160 *contigs* ao nível de transcritos gênicos e 222.664 *contigs* ao nível de transcritos com *splicings* alternativos, que correspondem aos mais de 35 mil genes presentes no genoma de *V. unguiculata*. O tamanho médio dos *contigs* foi de 497 pb e o N50 (identifica o tamanho do contig que a soma dos comprimentos de todos os *contigs* de comprimentos maiores ou iguais a ele representem 50% das bases da montagem) de 1.399 pb. Tais resultados de tamanho e cobertura do transcriptoma evidenciam que o sequenciamento do RNA foi satisfatório.

Tabela 1. Total de *reads* de qualidade após processamento das bibliotecas de *Vigna unguiculata*. Total de *reads* de qualidade após processamento das bibliotecas de cDNA de *Vigna unguiculata* dos tempos 1 (1d) e 8 dias (8d) **PC** – Pitiúba controle; **PS** – Pitiúba sal; **TC** – TVU controle; e **TS** – TVU sal.

<i>Bibliotecas de cDNA</i>	<i>Total de reads brutos</i>	<i>Total de reads de qualidade</i>
PC 1d	6.857.000	6.476.365
PS 1d	6.857.400	6.475.622
TC 1d	6.858.000	6.476.112
TS 1d	6.857.000	6.476.103
PC 8d	7.920.732	7.499.225
PS 8d	7.920.000	7.499.082
TC 8d	7.921.000	7.498.941
TS 8d	7.920.700	7.499.080
Total	59.112.000	55.900.530

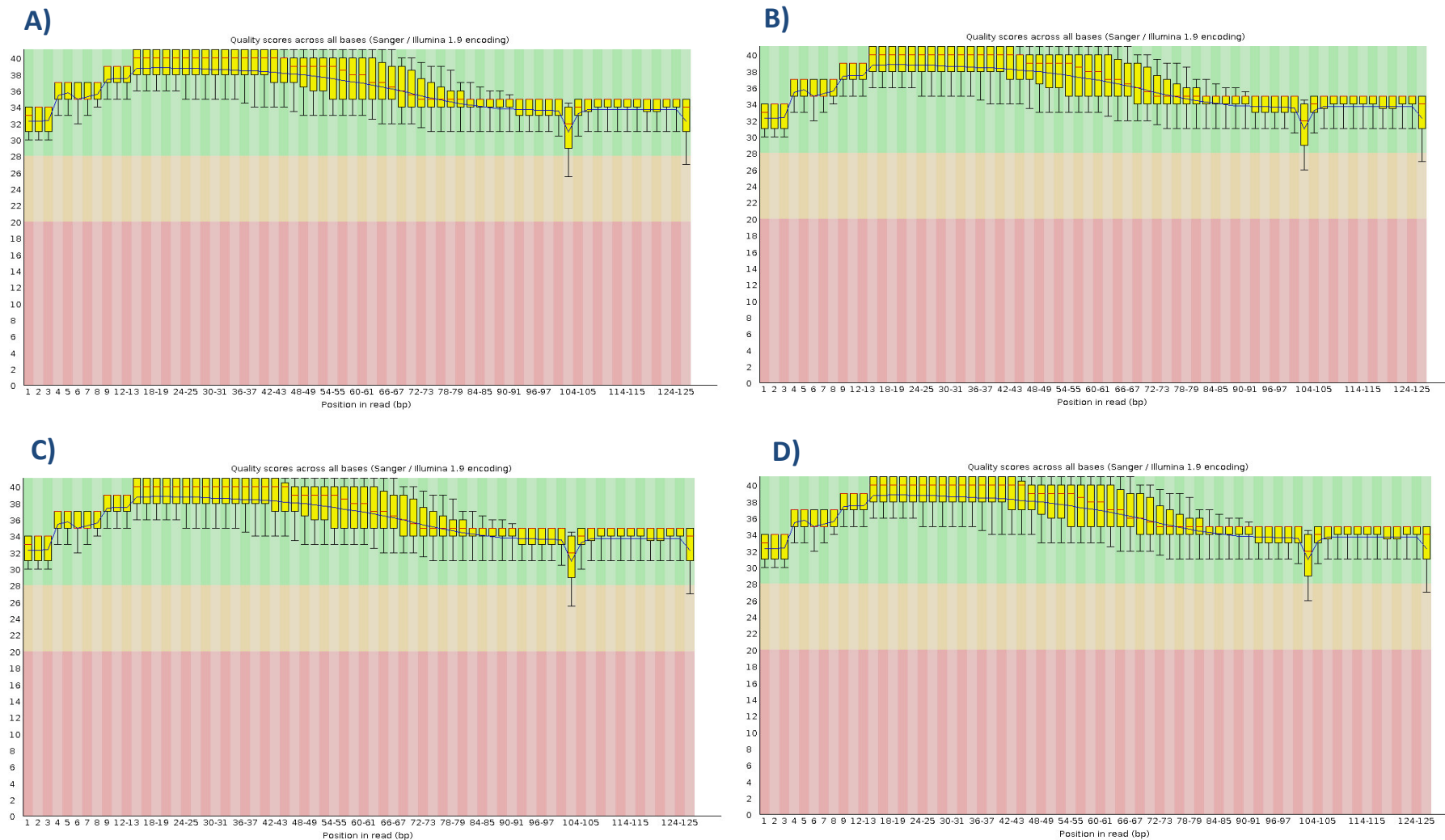
Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.3. Análise dos genes diferencialmente expressos (GDEs)

5.1.3.1 - Total de genes identificados e número de GDEs

Neste estudo foram identificados 7.138 genes como diferencialmente expressos (GDEs) (após análise dos 150.160 *contigs*), quando empregado o ponto de corte $\log_2 \text{fold change} \geq 1$ ou $\log_2 \text{fold change} \leq -1$. Entretanto, quando utilizou-se como ponto de corte o $p\text{-value} < 0,01$, o número de GDEs foi reduzido para 416 (**Tabela 2**), sendo esse o montante analisado nas etapas posteriores. Convém salientar que, alguns genes foram identificados como GDEs em mais de uma comparação (**Figura 4**); assim, um montante de 267 genes foi o número total de GDEs (sem considerar os genes compartilhados em mais de uma comparação) nas folhas de *V. unguiculata*. Em todos os casos, dentro de cada comparação, os GDEs foram classificados como regulados positivamente (*up*) e negativamente (*down*) (**Tabelas S1 e 2**).

Figura 3. Qualidade das bibliotecas de cDNA das folhas de plantas dos genótipos pitiúba (A e B) e TVU (C e D), gerados pelo FastQC após a filtragem das sequências de baixa qualidade com o Trimmomatic. À esquerda estão os gráficos dos grupos controle e à direita aqueles submetidos a tratamento com 100 mM de NaCl. Nos gráficos, a qualidade das sequências é apresentada da seguinte forma: faixa verde - qualidade boa; faixa amarela – intermediária; e faixa rosa – baixa qualidade.



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 2. Número de genes diferencialmente expressos (GDEs) que apresentaram regulação positiva (*up*) e negativa (*down*), nas folhas (1 e 8 dias) de dois genótipos de *Vigna unguiculata*, em função dos diferentes tratamentos. **PC** – Pitiúba controle; **PS** – Pitiúba sal; **TC** – TVU controle; e **TS** – TVU sal.

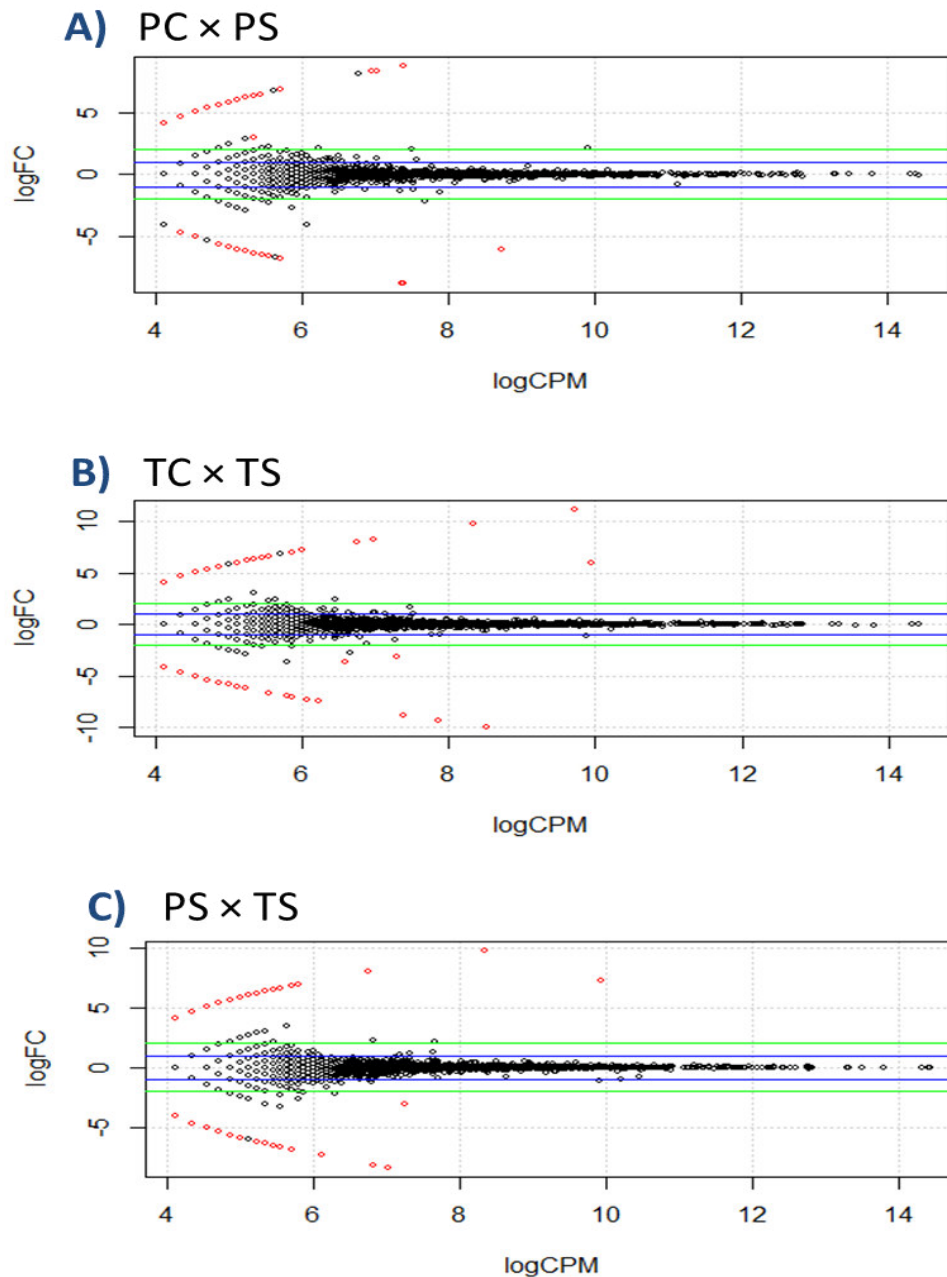
Comparações	GDEs (<i>up</i>)	GDEs (<i>down</i>)	GDEs totais
PC × PS 1d	37	28	65
TC × TS 1d	41	32	73
PC × PS 8d	36	31	67
TC × TS 8d	33	29	62
PS × TS 1d	33	33	66
PS × TS 8d	42	41	83
Total	222	194	416

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.3.2 Diagramas de dispersão (*MA plots*)

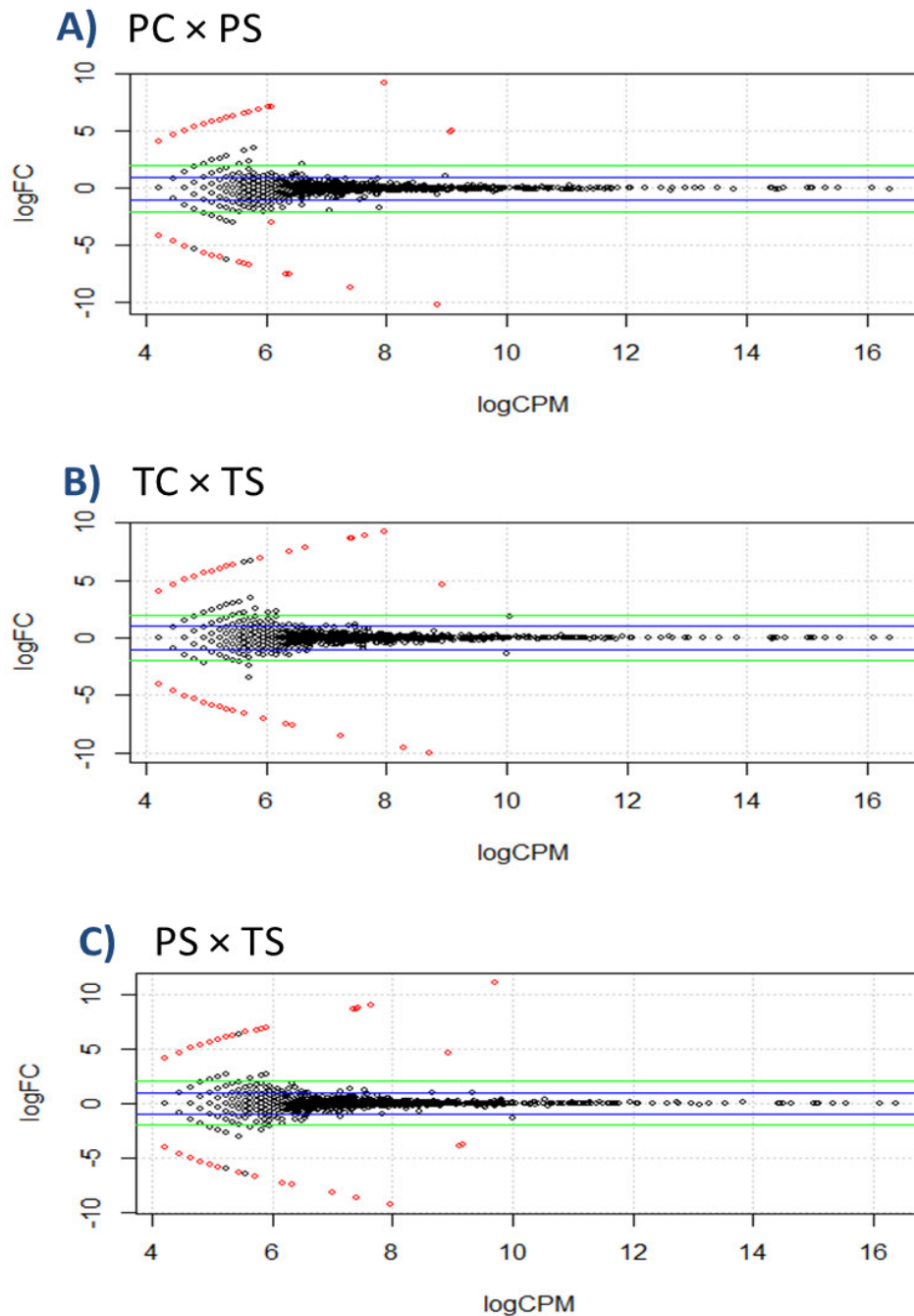
A representação gráfica dos DGEs que mostraram expressão aumentada (*up*) e/ou reduzida (*down*) nas diferentes comparações está destacada em pontos vermelhos nos diagramas de dispersão (*MA plots*) (**Figuras 4 e 5**). De maneira geral, a maioria dos GDEs identificados apresentaram valores de $\log_2 \text{fold change} \leq -6$ (*down*) ou ≥ 6 (*up*), o que corresponde a um valor de expressão pelo menos 12 vezes maior ou menor em uma dada comparação. No primeiro tempo de análise (1 d de estresse salino), o maior número de GDEs foi identificado na comparação TC × TS, com 73 genes (**Figura 4**); enquanto no oitavo dia da imposição do estresse, com um total de 85 genes, a comparação entre os tratamentos salinos (PS x TS) foi a que apresentou maior quantidade de GDEs (**Figura 5**).

Figura 4 - MA plots resultantes da comparação entre os logaritmos de contagem por milhão (logCPM) e de *fold change* (logFC) dos genes diferencialmente expressos (GDEs) nas folhas das plantas dos genótipos pitiúba e TVU, após 1 d de estresse salino com NaCl a 100 mM. Os pontos vermelhos representam os GDEs ($p\text{-value} < 0.01$), enquanto os pretos representam genes que não apresentaram expressão diferencial ($p\text{-value} > 0.01$). GDEs com $-1 \leq \log_2 \text{fold change} \leq 1$ estão representados fora dos limites das linhas azuis, ao passo que os GDEs com $-2 \leq \log_2 \text{fold change} \leq 2$ se encontram externamente as linhas verdes. Os GDEs das comparações Pitiúba controle (PC) \times Pitiúba sal (PS), TVU controle (TC) \times TVU sal (TS) e Pitiúba sal (PS) \times TVU sal (TS) são apresentados em **A**, **B** e **C**, respectivamente.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 5. MA plots resultantes da comparação entre os logaritmos de contagem por milhão (logCPM) e de *fold change* (logFC) dos genes diferencialmente expressos (GDEs) nas folhas das plantas dos genótipos pitiúba e TVU, após 8 d de estresse salino com NaCl a 100 mM. Os pontos vermelhos representam os GDEs ($p\text{-value} < 0.01$), enquanto os pretos representam genes que não apresentaram expressão diferencial ($p\text{-value} > 0.01$). GDEs com $-1 \leq \log_2 \text{fold change} \leq 1$ estão representados fora dos limites das linhas azuis, ao passo que os GDEs com $-2 \leq \log_2 \text{fold change} \leq 2$ se encontram externamente as linhas verdes. Os GDEs das comparações Pitiúba controle (PC) \times Pitiúba sal (PS), TVU controle (TC) \times TVU sal (TS) e Pitiúba sal (PS) \times TVU sal (TS) são apresentados em **A**, **B** e **C**, respectivamente.



Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.3.3 Padrão de regulação dos GDEs

O montante de GDEs específicos para uma comparação e aqueles comuns a mais de uma comparação (interseção) são apresentados na **Figura 6**. De maneira geral, diversos genes foram regulados positivamente ou negativamente em função do estresse salino (PC × PS e TC × TS), em ambos os genótipos de *V. unguiculata*. Além disso, sob condições de salinidade, inúmeros genes apresentaram diferentes níveis de expressão nas folhas dos genótipos Pitiúba e TVU (PS × TS).

Na primeira coleta (1 d), no genótipo pitiúba, um total de 37 e 28 GDEs foram regulados positivamente e negativamente pelo estresse salino, respectivamente (**Figura 6A**). Já no TVU foram identificados 41 GDEs regulados positivamente e 32 regulados negativamente. Vale ressaltar que, do total de GDEs modulados pela salinidade, a modulação de 6 deles foi comum em ambos os genótipos de *V. unguiculata*, sendo 3 *up* e 3 *down*.

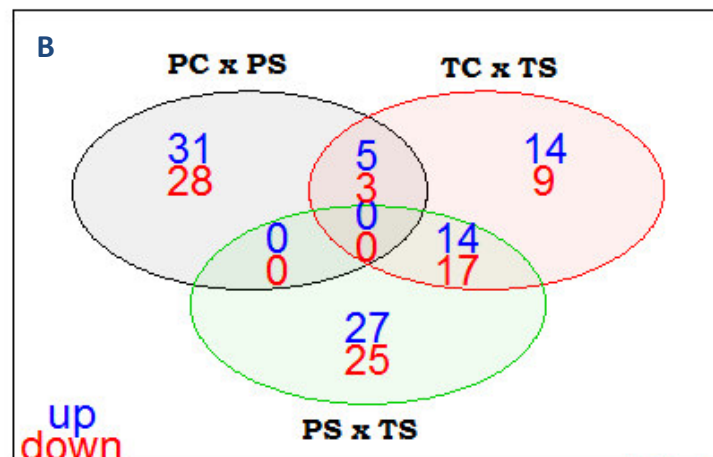
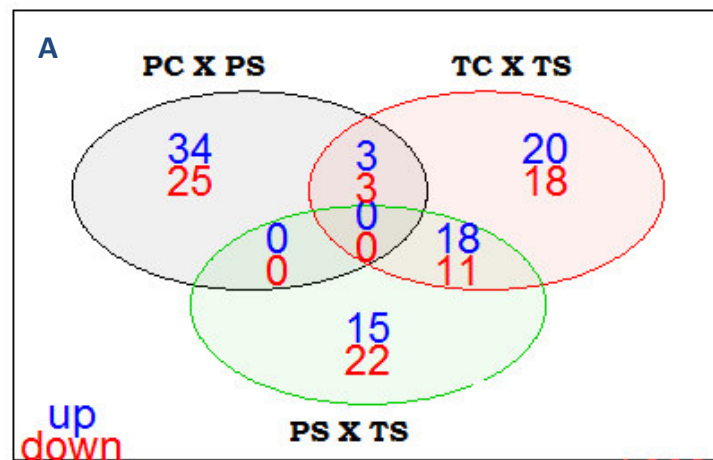
Quando os GDEs dos grupos tratados com NaCl foram confrontados (PS × TS), observou-se que 33 genes apresentaram maiores níveis de expressão no genótipo TVU e, de modo similar, 33 no Pitiúba (**Figura 6A**). Desse total, 18 e 11 GDEs regulados positivamente e negativamente, respectivamente, foram comuns entre as comparações TC × TS e PS × TS. Interessantemente, não foi detectado nenhum GDE compartilhado entre as três comparações, bem como não houve GDE comum a comparação PC × PS e PS × TS.

Resultados similares foram observados no segundo tempo de coleta (8 dias), porém, o maior número de GDEs (83) foi detectado na comparação PS × TS, sendo que 41 genes apresentaram maiores níveis de expressão nas plantas estressadas do genótipo TVU, e 42 naquelas estressadas do genótipo Pitiúba (**Figura 6B**).

No genótipo Pitiúba, um total de 36 genes apresentou incrementos na expressão sob estresse salino, ao passo que 31 genes mostraram reduções. Por outro lado, no TVU, 33 genes foram mais expressos nas folhas das plantas expostas ao excesso de sais, enquanto 29 apresentaram regulação negativa sob estresse. Contudo, do total de genes modulado pela salinidade, oito (5 *up* e 3 *down*) deles foram comuns em ambos os genótipos.

Na **Tabela S1** (Anexo 1) estão listados todos os GDEs identificados nas folhas das plantas de *V. unguiculata*, após 1 e 8 dias de estresse salino, bem como o tipo de regulação na expressão em cada comparação (PC × PS, TC × TS ou PS × TS) a partir do valor do \log_2 *fold change*(logFC).

Figura 6 - Diagramas de *Venn* mostrando o montante de genes diferencialmente expressos (GDEs) específicos e compartilhados entre as comparações Pitiúba controle (PC) × Pitiúba sal (PS), TVU controle (TC) × TVU sal (TS) e Pitiúba sal (PS) × TVU sal (TS). Os diagramas foram gerados com os GDEs regulados positivamente (*up*, em azul) e negativamente (*down*, em vermelho) que apresentaram *p-value* < 0,01 com $-1 \leq \log_2 \text{fold change} \geq 1$, após 1 (A) e 8 dias (B) dias da imposição dos tratamentos salinos.



Fonte: elaborado pelo autor.

De modo geral, dentre os genes que apresentaram regulação diferencial pelo estresse salino, o maior número (50) codifica proteínas envolvidas em processos de sinalização, seguido por aqueles relacionados ao aparato fotossintético (35), homeostase iônica (18), fitohormônios (18), estresse oxidativo (8) e outros processos metabólicos/homeostase bioquímica (100). Além disso, 38 genes foram identificados como diferencialmente expressos, mas, como ainda não possuem função conhecida, foram classificados como desconhecidos/não caracterizados. Essa afirmação foi feita baseando-se em conhecimentos prévios de vias metabólicas que os genes poderiam estar envolvidos durante a aclimatação ao estresse salino. Mesmo assim, para identificar funções adicionais dos genes e/ou a atuação em conjunto de vias metabólicas nas respostas ao estresse, foi conduzida uma análise refinada dos GDEs através da categorização funcional.

5.1.4 Categorização funcional dos GDEs (ontologia gênica - GO e identificação de vias metabólicas – KEGG)

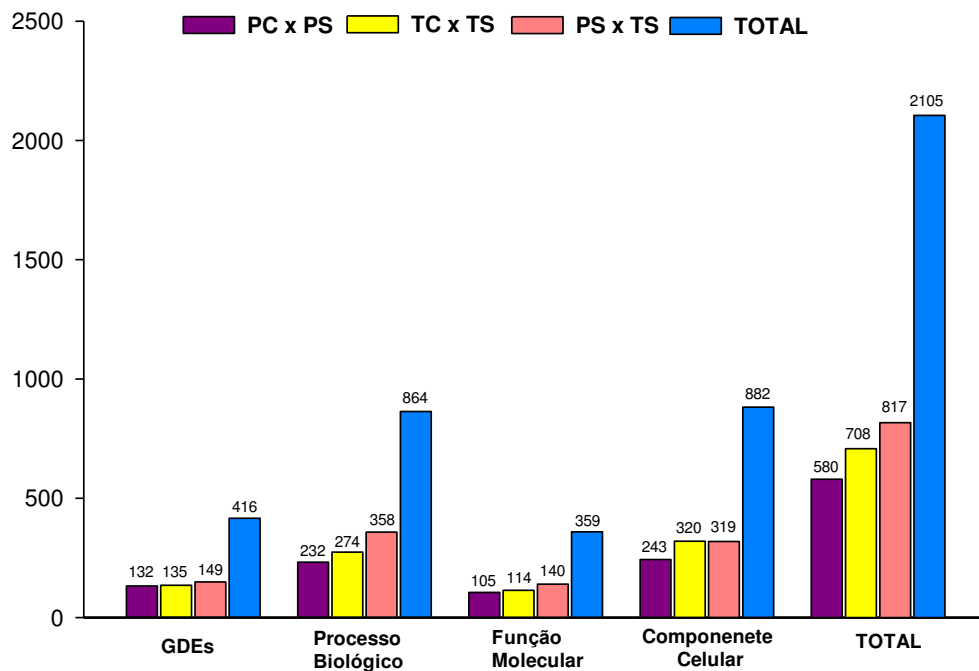
A análise funcional através da ontologia gênica (GO) consistiu em atribuir categorias aos genes diferencialmente expressos. Para isso, os GDEs foram inicialmente enriquecidos quanto à função e, em seguida, categorizados nos termos processo biológico, componente celular e função molecular. É importante destacar que, durante o enriquecimento, mais de um termo GO pode ter sido atribuído ao mesmo gene; ou seja, um gene que exerce mais de uma função (por exemplo, participa de duas ou três vias metabólicas) e que, portanto, nos diferentes processos celulares pode ter sido enquadrado em mais de um termo/categoria. Assim, durante a apresentação dos resultados, o número de genes descritos para uma determinada classe pode não coincidir com o montante de genes inserido nas figuras.

Os montantes totais e específicos dos genes enriquecidos em cada comparação, dentro de cada termo/categoria, encontram-se detalhados na **Figura 7**. De modo geral, do total de 416 GDEs, houve enriquecimento de 2.105 genes (100% das anotações), dos quais 864 (41%) foram enquadrados no termo processo biológico, 882 (42%) em componente celular e 359 (17%) em função molecular (**Figura 7**).

No termo processo biológico foram categorizados 232 genes no genótipo Pitiúba (PC × PS), 274 no genótipo TVU (TC × TS) e 358 termos identificados na comparação entre os genótipos (PS × TS). Já na categoria componente celular, 243 termos foram categorizados no Pitiúba, 320 no TVU e 319 na comparação PS × TS. Por fim, no termo função molecular, 105

genes foram identificados no Pitiúba, 114 no TVU e 140 na comparação entre os genótipos (Figura 7).

Figura 7. Número e distribuição dos genes diferencialmente expressos (GDEs) nas diversas comparações entre os genótipos de *Vigna unguiculata*. Os GDEs foram enriquecidos e enquadrados nas categorias processo biológico, componente celular e função molecular. PC - Pitiúba controle; PS - Pitiúba sal; TC - TVU controle; e TS - TVU sal.



Fonte: elaborado pelo autor.

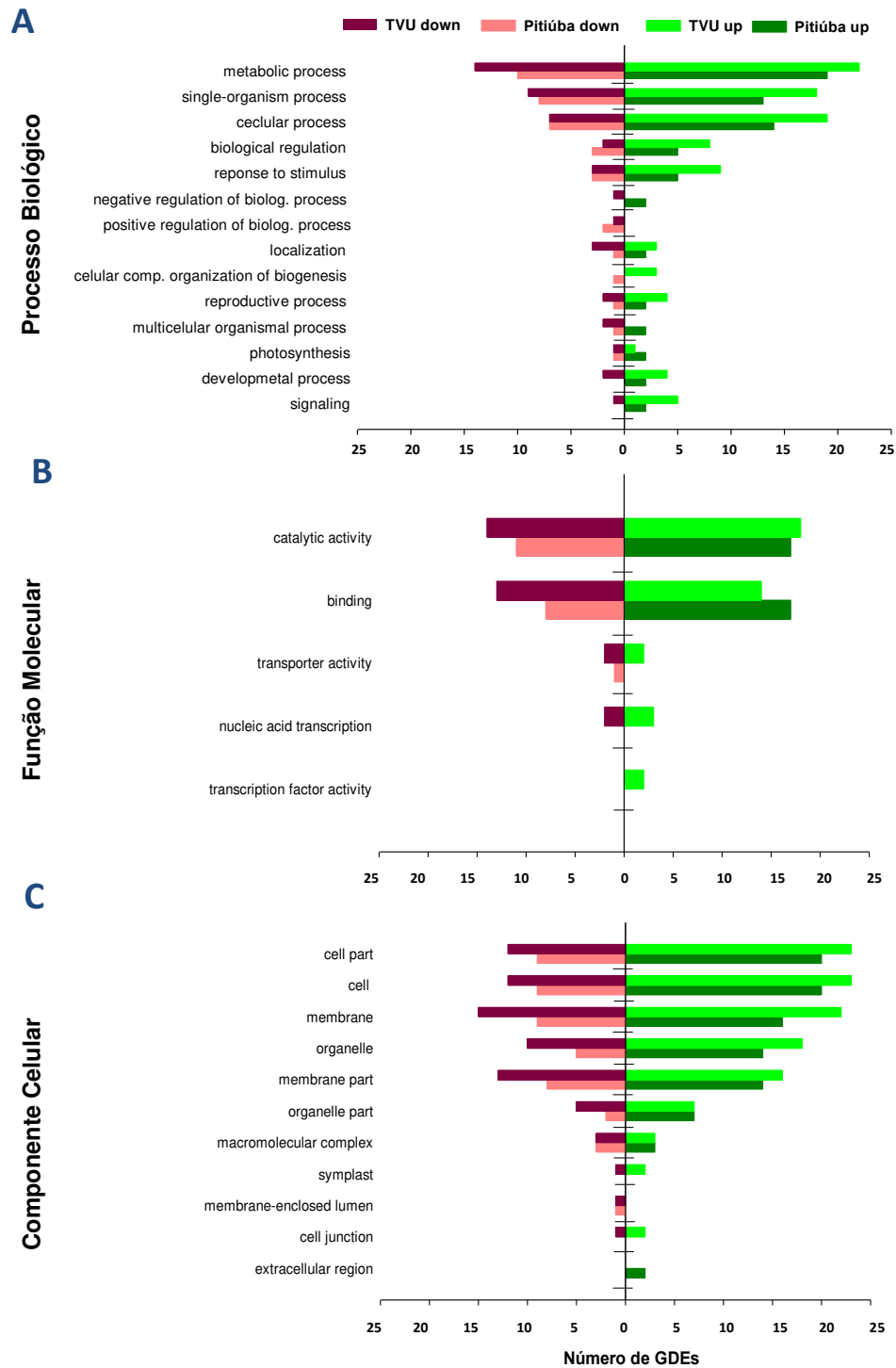
Após 1 d de estresse salino, no termo processo biológico, o maior número de GDEs foi concentrado em processos metabólicos e celulares, independente do tipo de regulação e do genótipo de *V. unguiculata* (Figura 8A). Convém salientar que, nessa mesma categoria, plantas do genótipo Pitiúba apresentaram regulações diferenciais na expressão de genes que atuam na modulação de processos biológicos, havendo aumentos na expressão daqueles que regulam negativamente tais eventos (*Ethylene-responsive sensor 1-like*, ID - TR31141; *Auxin responsive fator*, ID - TR31141) (Figura 9), e reduções na expressão de genes envolvidos na regulação positiva (*E3 ubiquitin-protein ligase rbr A*, ID - TR31051; *26S protease regulatory*, ID - TR23992) (Figura 8A). Além disso, plantas Pitiúba sob salinidade apresentaram incrementos na expressão de genes que codificam para componentes estruturais do aparato fotossintético (*Oxygen-evolving enhancer protein*, ID - TR57499; *Photosystem II core complex*, ID - TR3270) (Figura 10), moléculas regulatórias (*SNF1-related protein*

kinase, ID – TR8318) e inúmeras enzimas (por exemplo, *L-galactose dehydrogenase*, ID – TR12277; *Lipase*, ID – TR49585; *Long chain acyl-Coa synthetase 9*, ID TR85672; *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, ID – TR85680; *NADH-dehydrogenase*, ID – TR2542; *Palmitoyl-protein thioesterase 1*, ID – TR22077) (**Figuras 11, 12 e 13**) (**Tabela S1**). Ao mesmo tempo, plantas desse genótipo apresentaram decréscimos nos níveis de expressão de genes que codificam fosfolipases A1 (ID - TR40998), proteínas do tipo PGR5 (*PGR5-like protein 1A*, ID: TR57929), dentre outros (**Tabela S1**).

Por outro lado, plantas estressadas do genótipo TVU apresentaram incrementos na expressão de diversos genes relacionados a eventos de sinalização/respostas a estímulos (*Auxin-responsive protein IAA14*, ID - TR85880; *Casein kinase I-like*, ID - TR53516; *CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 3*, ID – TR46607; *Chloroplastic lipocalin*, ID - TR1201; *Ethylene-responsive transcription*, ID – TR38364; *Gibberellin receptor GID1B*, ID - TR92673; *Interferon-related developmental regulator*, ID – TR47979; *Phospholipase A1-IIdelta*, ID - TR40998; *Protein TIFY 6B*, ID – TR19475; *RNA polymerase sigma factor sigB*, ID – TR16530; e *WRKY transcription*, ID – TR35646) (**Figura 9**) e em processos de desenvolvimento (*Peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein*, ID - TR21258; e *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO)*, ID – TR78458) (**Figura 8A**).

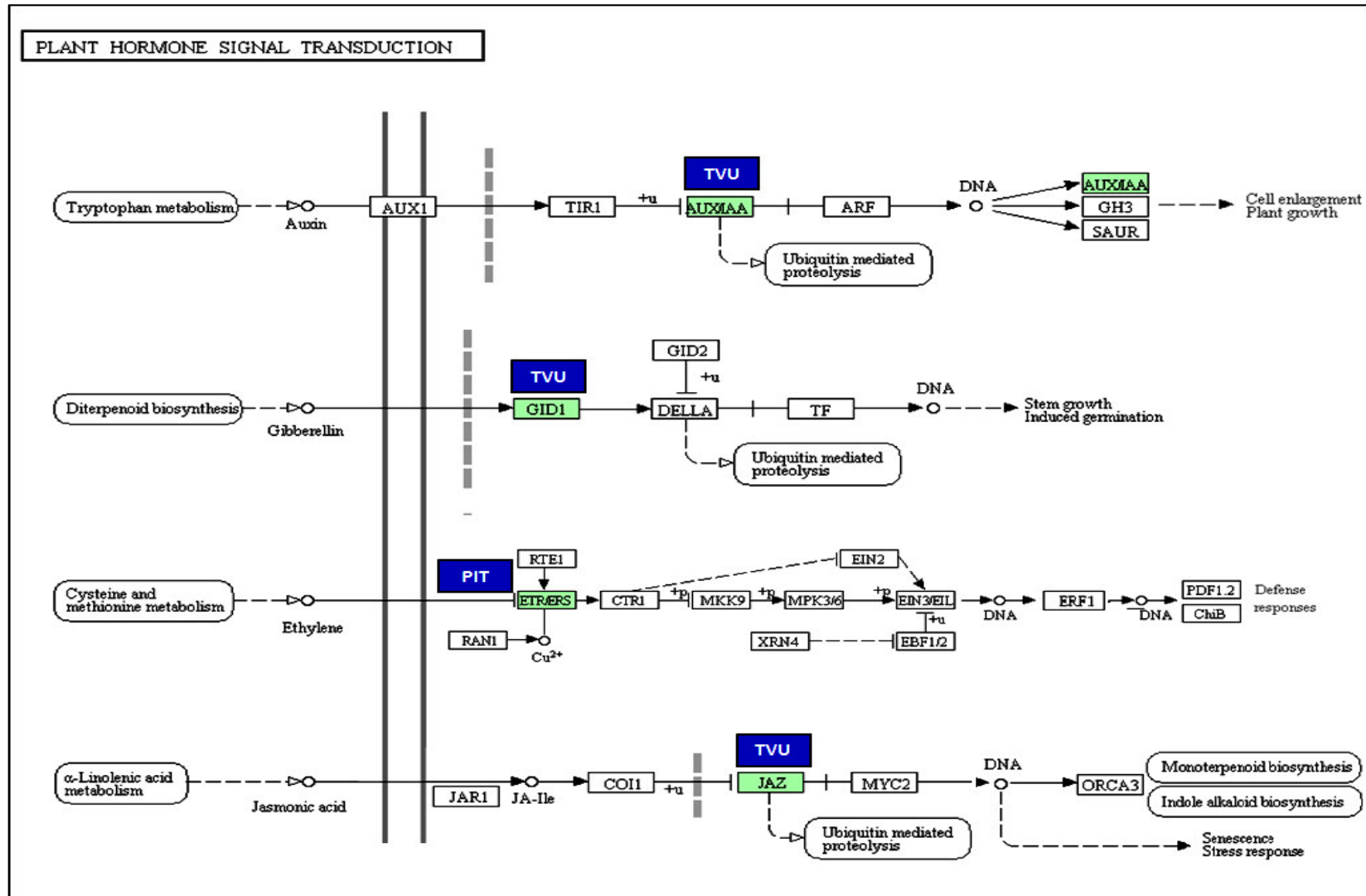
Adicionalmente, plantas TVU estressadas com NaCl também apresentaram regulação positiva na expressão de genes estruturais da CTE dos tilacóides (*Oxygen-evolving enhancer protein*, ID – TR57499; *Light-harvesting complex I chlorophyll A/B-binding protein*, ID – TR354) (**Figura 10**), bem como na expressão de genes que codificam fosfolipases A1 (ID - TR40998) e para diversas enzimas (dentre eles, os genes *Phosphoglycerate kinase*, ID – TR23596; *Pyruvate dehydrogenase E1*, ID – TR6147; e *Pyruvate kinase*, ID – TR27733) (**Figuras 11 e 13**) (**Tabela S1**). Em contraste, plantas estressadas do genótipo TVU mostravam menor expressão de genes de vias de sinalização/respostas a estímulos, incluindo *Auxin response factor 2* (ID – TR27827), *Interferon-related developmental regulator* (ID – TR47979) *Pentatricopeptide repeat-containing protein*, (ID - TR19438), bem como dos genes *NAD(P)H-quinone oxidoreductase* (ID - TR48454) e *Outer envelope pore protein 16-3* (ID – TR30443) (**Tabela S1**).

Figura 8. Classificação dos genes diferencialmente expressos (GDEs) nas folhas dos genótipos de *Vigna unguiculata*, Pitiúba e TVU, dentro das categorias ontológicas (GO) processo biológico (A), função molecular (B) e (C) componente celular. As barras representam o montante de GDEs regulados positivamente (up) ou negativamente (down) após 1 dia de estresse salino com NaCl a 100 mM.



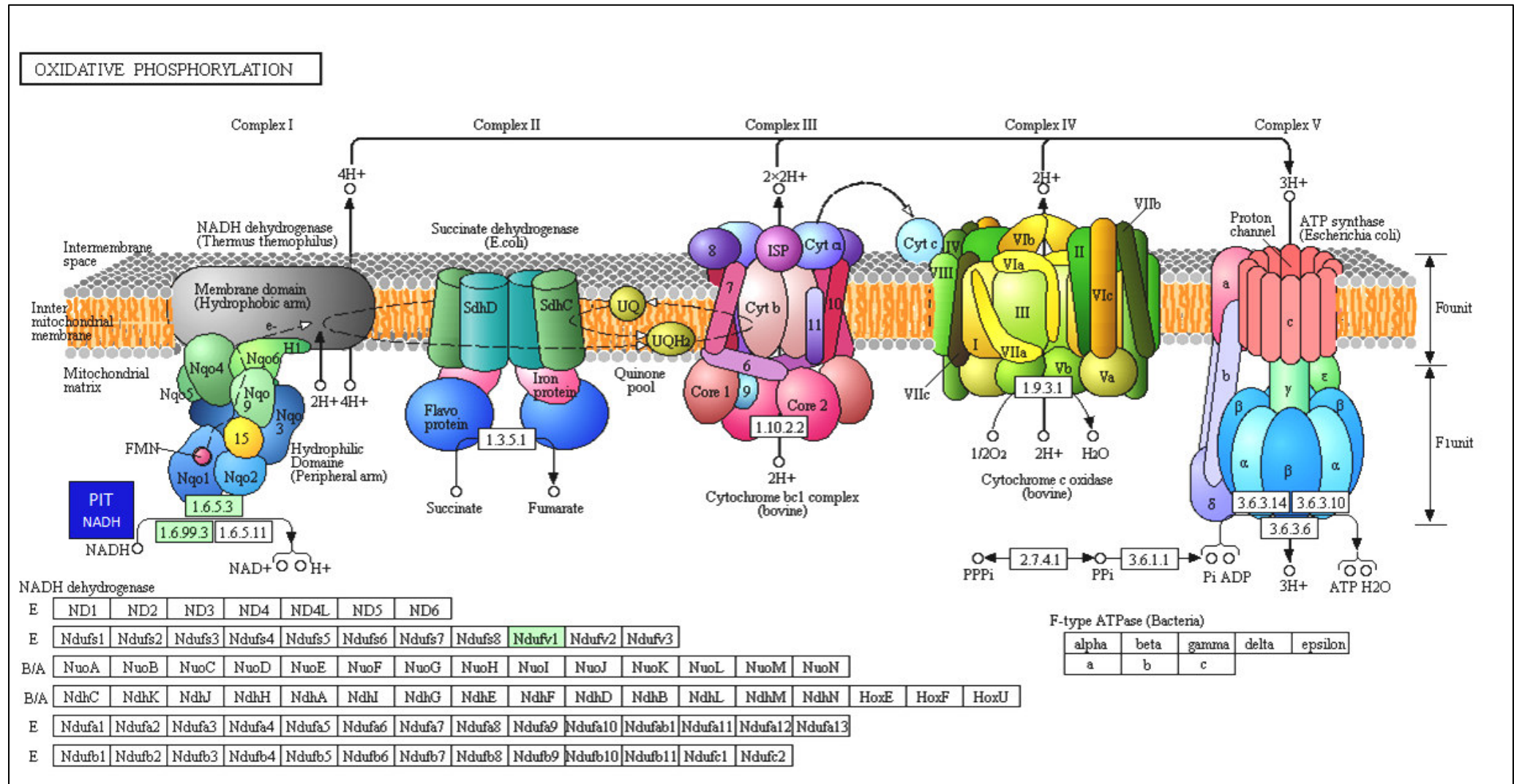
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 9. Genes das vias sinalização/hormônios/respostas a estímulos expressos diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de *Vigna unguiculata*, genótipos Pitiúba (PIT) e TVU, após 1 dia de imposição do estresse salino. Os GDEs regulados positivamente (azul) ou negativamente (vermelho), em um determinado genótipo, são destacados em caixas verdes. Abreviaturas: **AUXIAA** - *Auxin-responsive protein IAA* ; **GID1** - *Gibberellin receptor GID1* ; **ETR/ERS** - *Ethylene receptor*; **JAZ** - *Jasmonate ZIM domain-containing protein*.



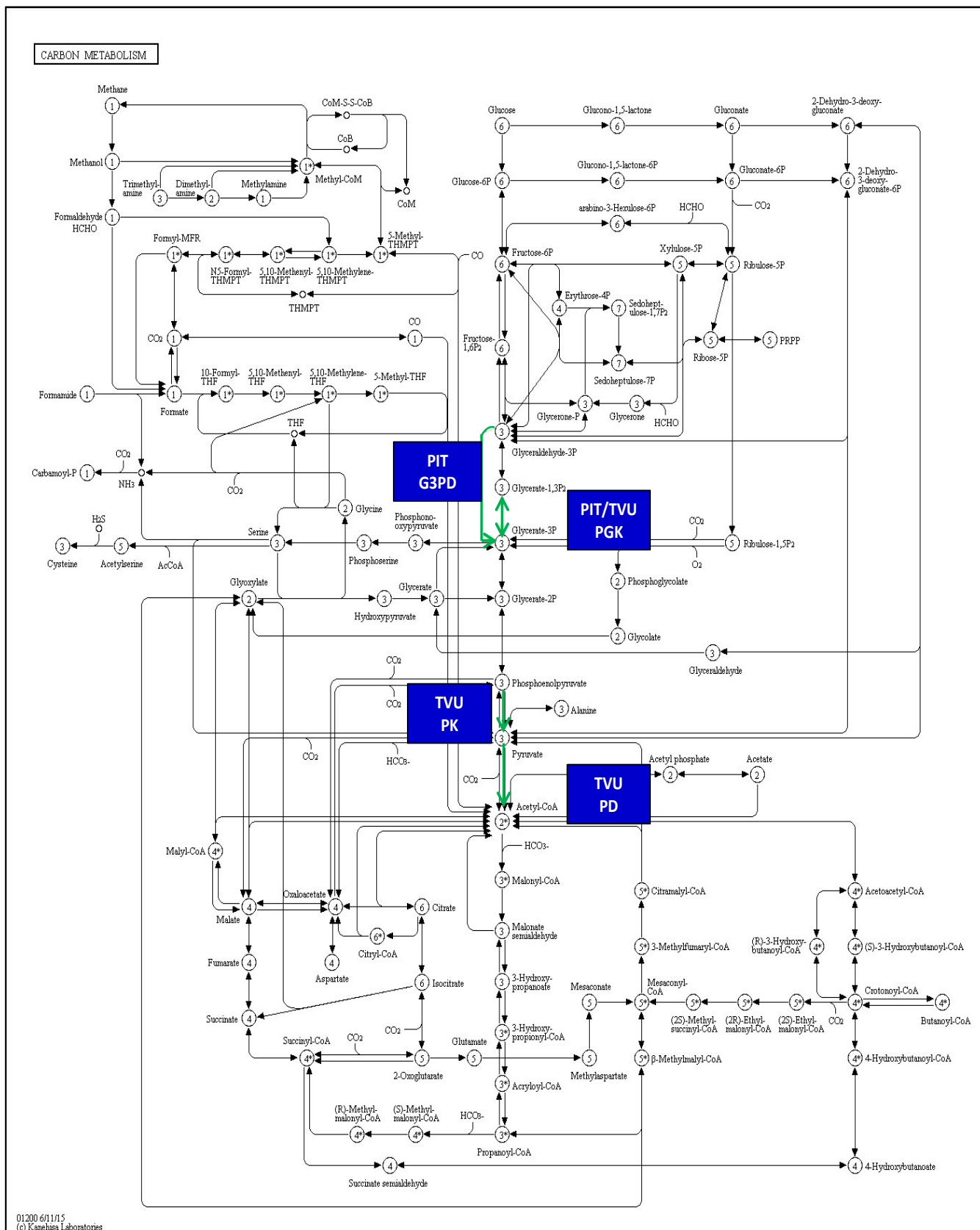
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 12. Genes envolvidos na fosforilação oxidativa expressos diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de *Vigna unguiculata*, genótipos Pitiúba (PIT) e TVU, após 1 dia de imposição do estresse salino. Os GDEs regulados positivamente (azul) ou negativamente (vermelho), em um determinado genótipo, são destacados em caixas verdes. Abreviaturas: **NADH** – *NADH-dehydrogenase*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 13. Genes do metabolismo do carbono expressos diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de *Vigna unguiculata*, genótipos Pitiúba (PIT) e TVU, após 1 dia de imposição do estresse salino. Os GDEs regulados positivamente (azul) ou negativamente (vermelho), em um determinado genótipo, são destacados em caixas verdes. Abreviaturas: **G3PD** - Gliceraldeido-3-phosphate dehydrogenase; **PGK** - Phosphoglycerate kinase; **PK** - Pyruvate kinase; **PD** - Pyruvate dehydrogenase.

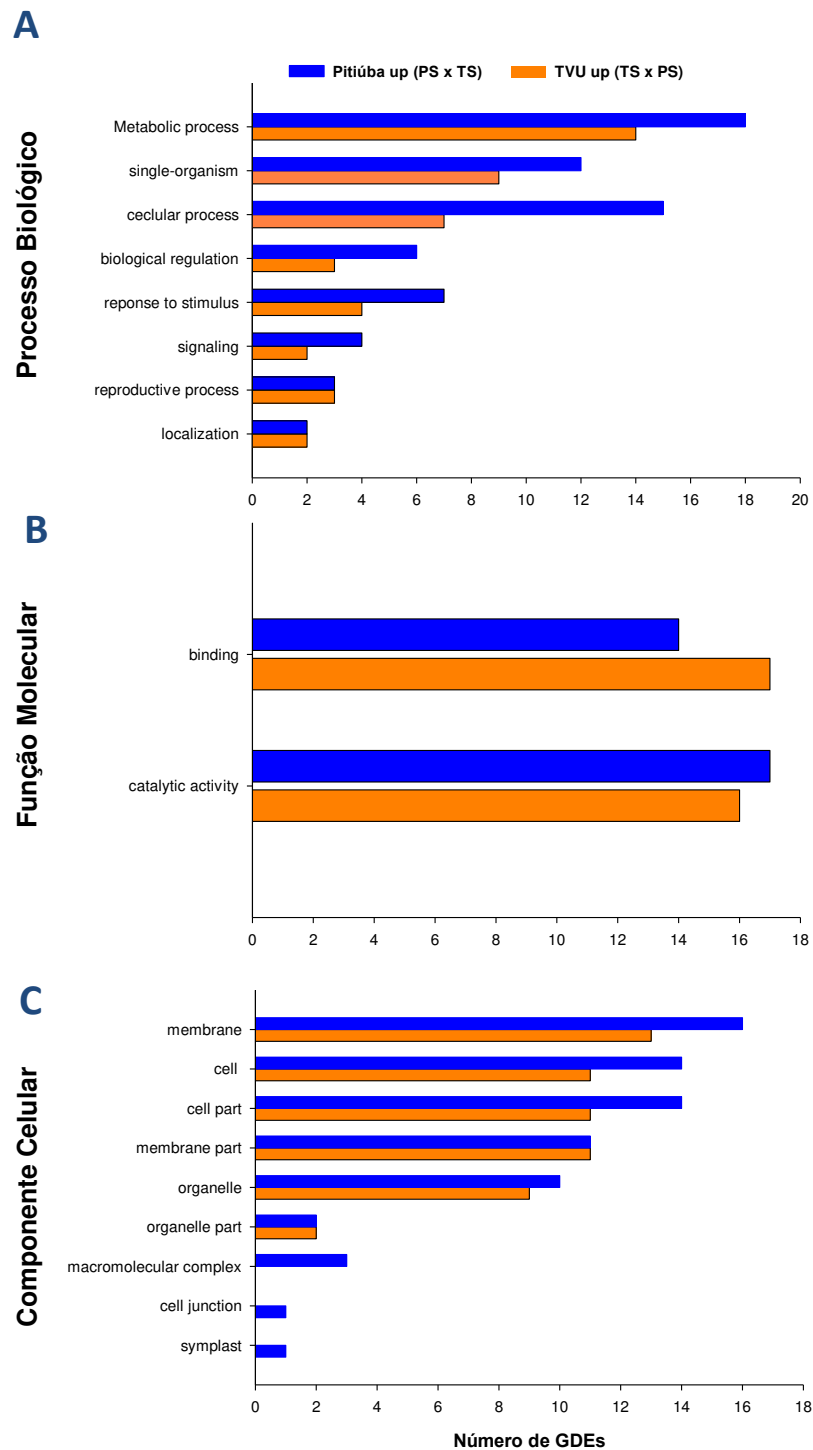


Já na categoria função molecular foram observados resultados interessantes, pois enquanto plantas do genótipo Pitiúba mostraram reduções na expressão do gene que codifica o transportador de manganês (*Metal tolerance protein 11*, ID – TR20989), aquelas do genótipo TVU apresentaram aumentos na expressão do gene que codifica um transportador de potássio (TR33846) e reduções naquele para transportador de aminoácido (TR25777) (**Figura 8B e Tabela S1**).

A análise comparativa do transcriptoma das plantas estressadas revelou que os genótipos de *V. unguiculata* apresentam um padrão similar na regulação na expressão de genes sob estresse; pois houve modulação basicamente nas categorias processo biológico e função molecular, diferindo apenas em alguns termos no componente celular (**Figura 14**). Contudo, no termo processo biológico, plantas TVU mostraram um número mais elevado de genes (com maiores níveis de expressão comparados aos do genótipo Pitiúba) envolvidos em processos celulares, incluindo vias de sinalização/resposta a estímulos (*Casein kinase I-like*, ID - TR53615; *Gibberellin receptor GID1B*, ID - TR92673; *CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 3*, ID – TR46607; *CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 14*, ID – TR4434; *Phospholipase A1-II*, ID – TR40998; e *Receptor protein kinase PK1*, ID – TR27753), fatores de transcrição (*EIN3-binding F-box protein 1*, ID – TR43677; *Translation initiation factor 4G-like*, ID – TR21884; *WRKY transcription*, ID – TR35646; e *Protein PXR1*, ID – TR57793), respostas ao estresse (*Chloroplastic lipocalin*, ID - TR1201; e *GTP diphosphokinase RSH2*, ID - TR23837), dentre outros (*1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO)*, ID – TR78458; *26S proteasome non-ATPase regulatory*, ID – TR16595; *Glutamyl-tRNA reductase-binding protein*, ID – TR8627 *Light-harvesting complex I chlorophyll A/B-binding protein*, ID – TR354 *Oxygen-evolving enhancer protein 3-2*, ID – TR57499; *PGR5-like protein*, ID – TR57929; *Phosphoglycerate kinase*, ID – TR23596; e *Potassium transporter*, ID - TR33846) (**Figura 14A e Tabela S1**).

Contrariamente, os GDEs relacionados a processos celulares com maiores valores de expressão no genótipo Pitiúba, em comparação com o TVU, incluem genes relacionados a vias de sinalização/resposta a estímulos (*Pentatricopeptide repeat-containing protein*, ID – TR19438; *Auxin response factor 2*, ID – TR27827; e *Auxin-responsive protein IAA14*, TR85880), fatores de transcrição (*RNA-binding protein 39-like*, ID – TR97231; e *WRKY transcription*, ID – TR35646), dentre outros.

Figura 14. Ontologia gênica (GO) dos genes diferencialmente expressos (GDEs) identificados na comparação Pitiúba Sal × TVU Sal (PS × TS), após 1 dia de estresse salino com NaCl a 100 mM. Os GDEs foram enquadrados nos termos processo biológico (A), função molecular (B) e (C) componente celular. As barras representam o número de GDEs que apresentaram maiores níveis de expressão no genótipo TVU (TVU up) ou no genótipo Pitiúba (Pitiúba up) sob salinidade.

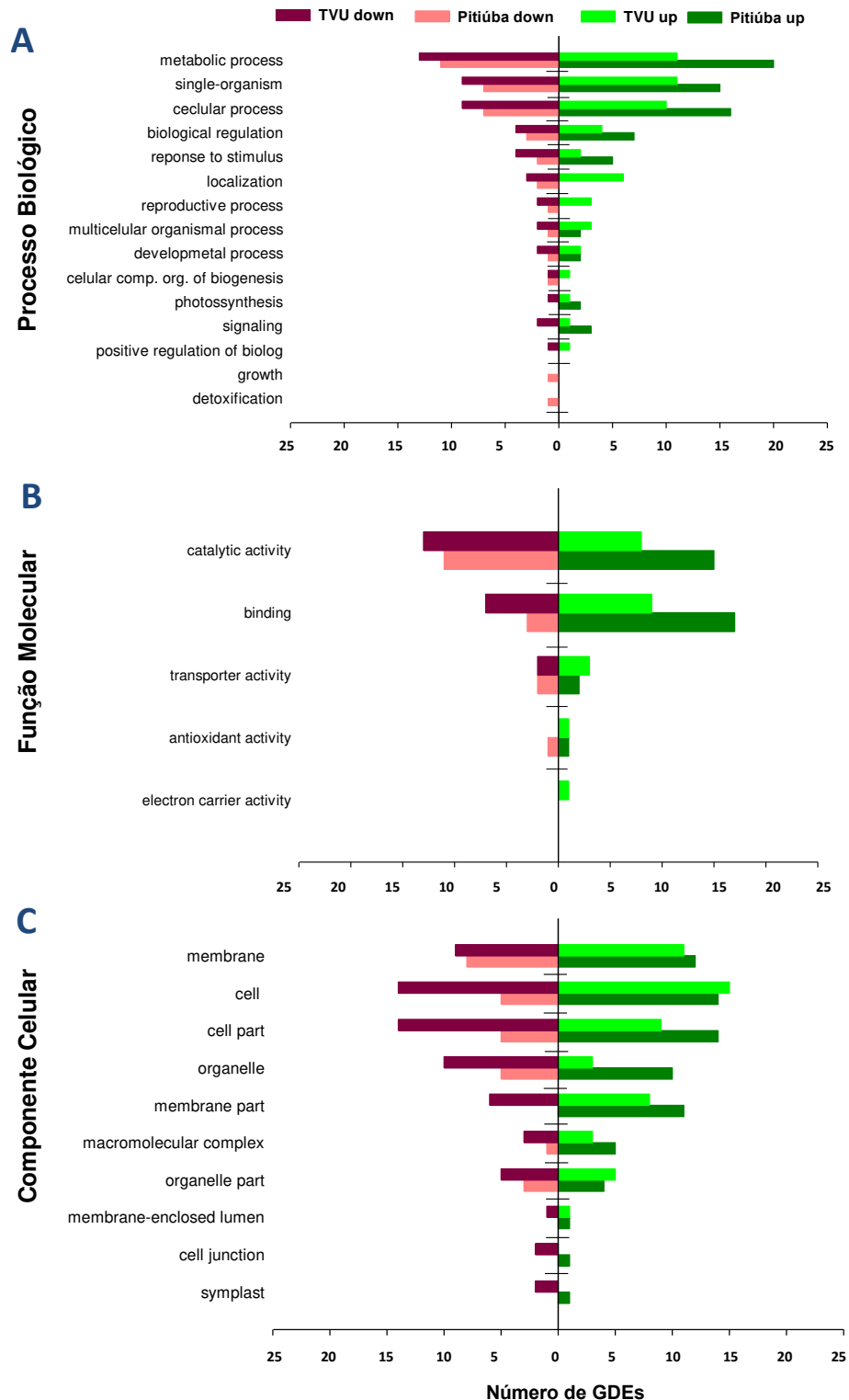


Fonte: elaborado pelo autor.

No segundo tempo de análise (8 d), a maior quantidade de GDEs foi concentrada no termo processo biológico, sendo observado um maior número de genes regulados positivamente pelo estresse nas folhas do genótipo Pitiúba, enquanto que um número mais elevado de sequências moduladas negativamente pela salinidade foi encontrado nas plantas estressadas do genótipo TVU (**Figura 15A**). Entretanto, sob condições de estresse, plantas do genótipo TVU ativaram positivamente (e exclusivamente) um conjunto de genes relacionados a localização (*Ferritin-3 chloroplastic*, ID – TR78581; e *Syntaxin-22*, ID – TR92670), metabolismo do carbono (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, ID – TR85680; *Cysteine synthase*, ID – TR20672) (**Figura 16**) e vias de sinalização/respostas a estímulos (*Gibberellin receptor GID1B*, ID – TR92673; e *Transcription factor TCP14*, ID – TR97109) (**Figuras 15A e 17**). Além disso, foram observados aumentos massivos na expressão dos genes *Stress responsive protein* (ID – TR27726) e *EIN3-binding F-box protein 1*, ID – TR43677 (**Tabela S1 e Figura 17**).

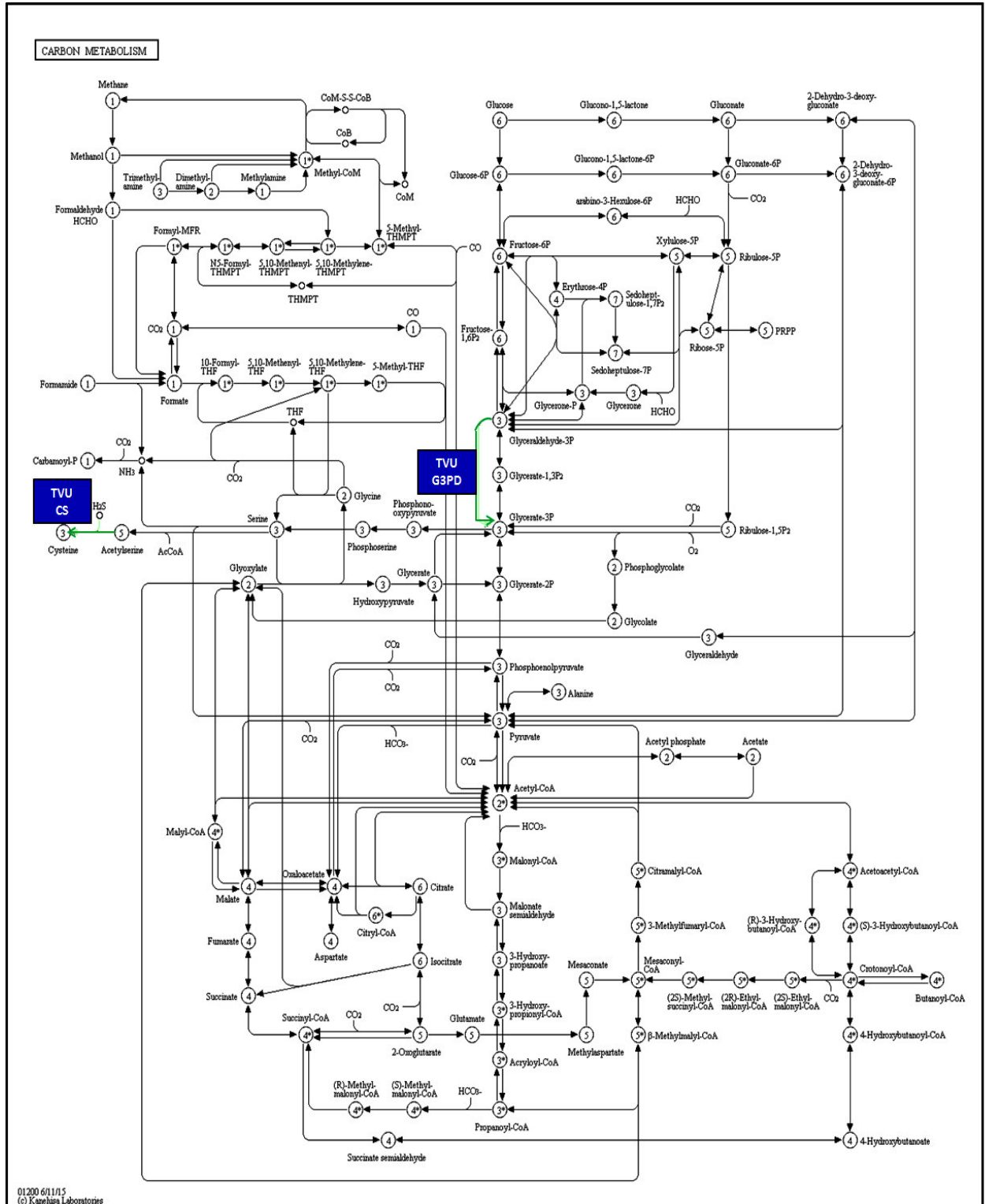
Em contraste, plantas estressadas do genótipo Pitiúba intensificaram a expressão de genes relacionados a regulação de processos biológicos (*Cyclin-dependent kinases regulatory*, ID – TR32600; *Initiation factor 4A*, ID – TR43710; *Methylesterase 17*, ID – TR9413; e *NAC domain-containing protein 2*, ID – TR6212), vias de sinalização/respostas a estímulos (*Mitogen-activated protein kinase kinase 9, MKK9*, ID – TR24001; *Calcium-dependent protein kinase 10*, ID – TR72474; *Auxin response factor 19*, ID – TR50382; e *Phospholipase A1*, ID – TR40998) (**Figura 17**); bem como dos genes *Catalase* (ID – TR85763), *Oxygen-evolving enhancer protein 3-2* (ID – TR71684), *Photosystem II core complex psbY* (ID – TR8249) e *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO)* (ID – TR78458) (**Tabela S1 e Figura 18**). Adicionalmente, plantas desse genótipo mostraram regulação negativa na expressão de genes relacionados a biossíntese de clorofila (**Tabela S1 e Figura 19**).

Figura 15. Classificação dos genes diferencialmente expressos (GDEs) nas folhas dos genótipos de *Vigna unguiculata*, Pitiúba e TVU, dentro das categorias ontológicas (GO) processo biológico (A), componente celular (B) e função molecular (C). As barras representam o montante de GDEs regulados positivamente (up) ou negativamente (down) após 8 dias de estresse salino com NaCl a 100 mM.



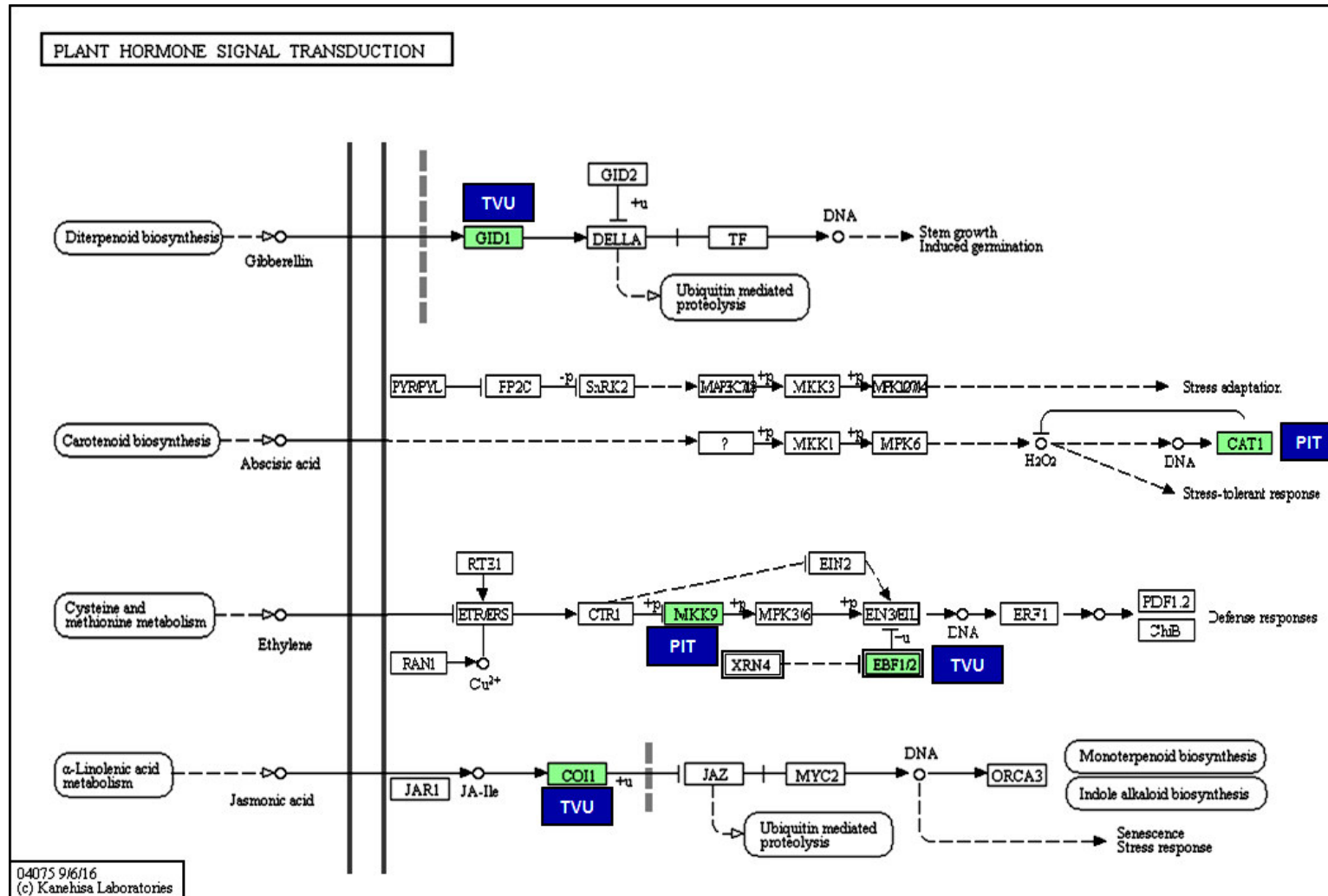
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 16. Genes do metabolismo do carbono expressos diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de *Vigna unguiculata*, genótipos Pitiúba (PIT) e TVU, após 8 dia de imposição do estresse salino. Os GDEs regulados positivamente (azul) ou negativamente (vermelho), em um determinado genótipo, são destacados em caixas verdes. Abreviaturas: **G3PD** - Gliceraldeído-3-phosphate dehydrogenase; **CS** - Cysteine synthase.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 17. Genes das vias sinalização/hormônios/respostas a estímulos expressos diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de *Vigna unguiculata*, genótipos Pitiúba (PIT) e TVU, após 8 dias de imposição do estresse salino. Os GDEs regulados positivamente (azul) ou negativamente (vermelho), em um determinado genótipo, são destacados em caixas verdes. Abreviaturas: **GID1** - *Gibberellin receptor GID1*; **CAT1** - *Catalase 1*; **MKK9** - Mitogen-activated protein kinase; **EBF1/2** - *EIN3-binding F-box protein 1/2*; **COI1** - Coronatine insensitive protein 1 .



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 18. Genes estruturais do fotossistema II expressos diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de *Vigna unguiculata*, genótipos Pitiúba (PIT) e TVU, após 8 dias de imposição do estresse salino. Os GDEs regulados positivamente (azul) ou negativamente (vermelho), em um determinado genótipo, são destacados em caixas verdes. Abreviaturas: **PsbQ** - *Photosystem II oxygen-evolving enhancer protein*; **PsbY** - *Photosystem II core complex proteins psbY*.

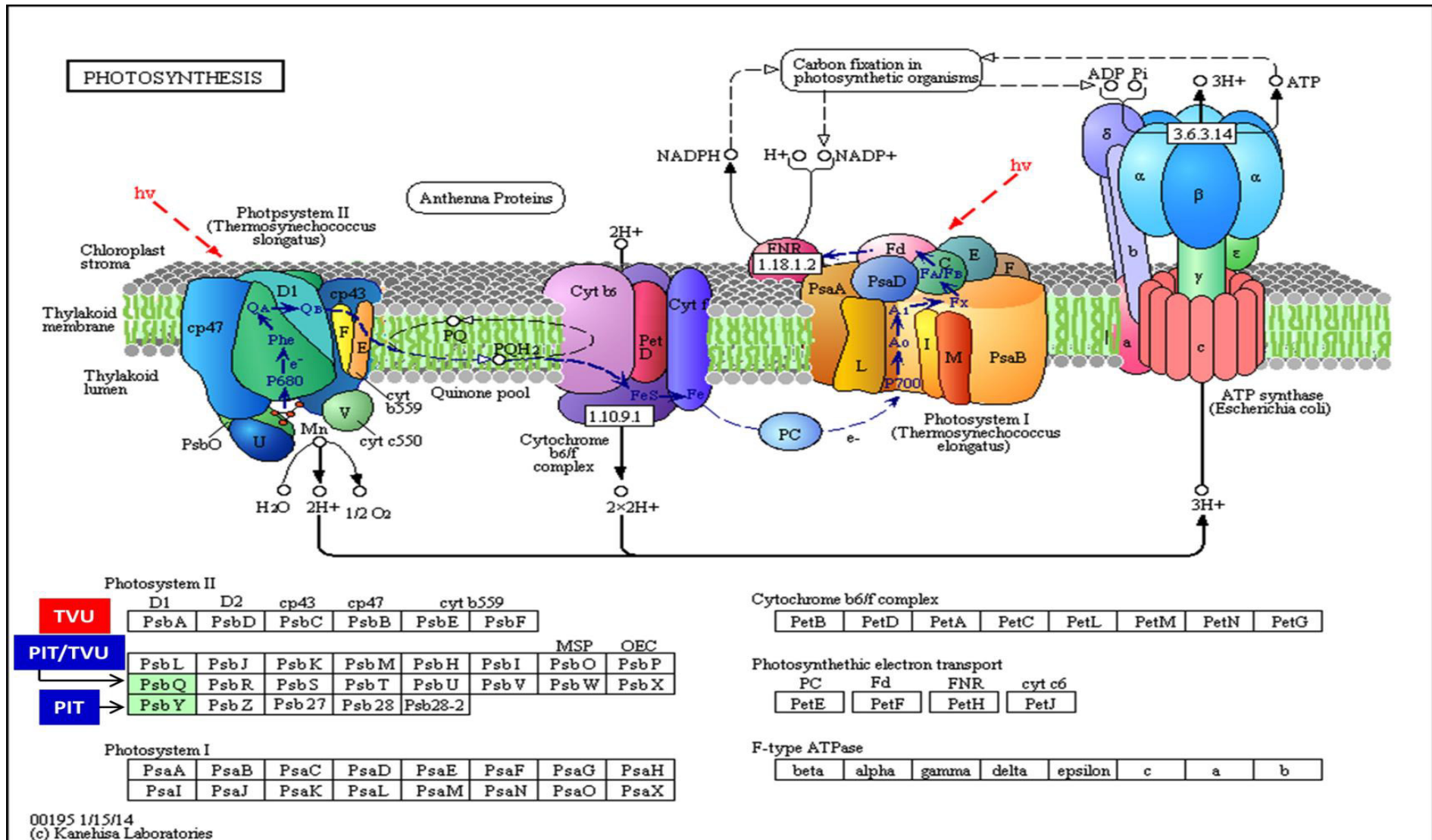
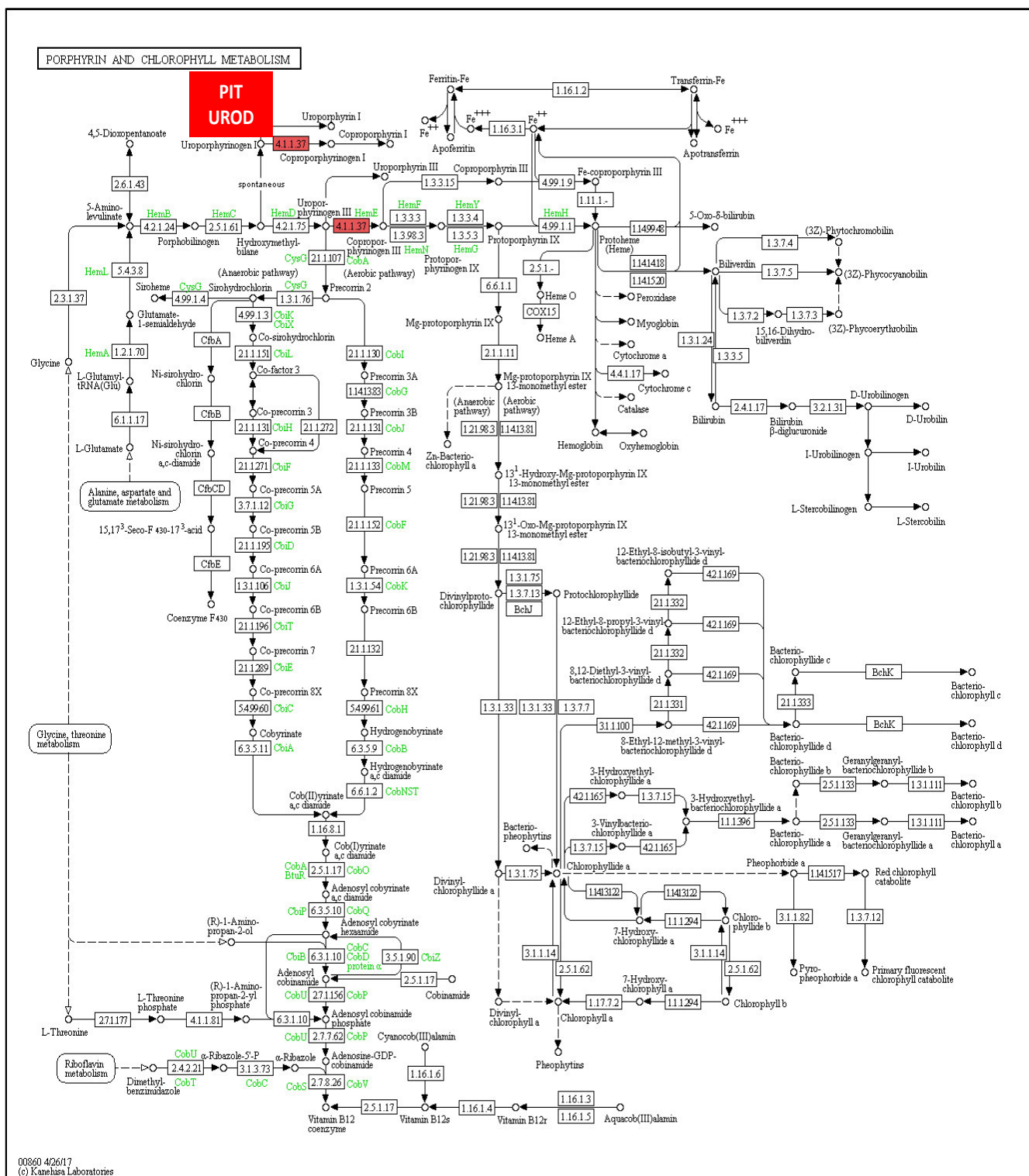


Figura 19. Gene da via de biossíntese de clorofilas expresso diferencialmente (GDEs) nas folhas de plantas de *Vigna unguiculata*, genótipos Pitiúba (PIT), após 8 dias de imposição do estresse salino. O gene **UROD** (*Uroporphyrinogen decarboxylase*) foi regulado negativamente (vermelho) pela salinidade.



Fonte: elaborado pelo autor.

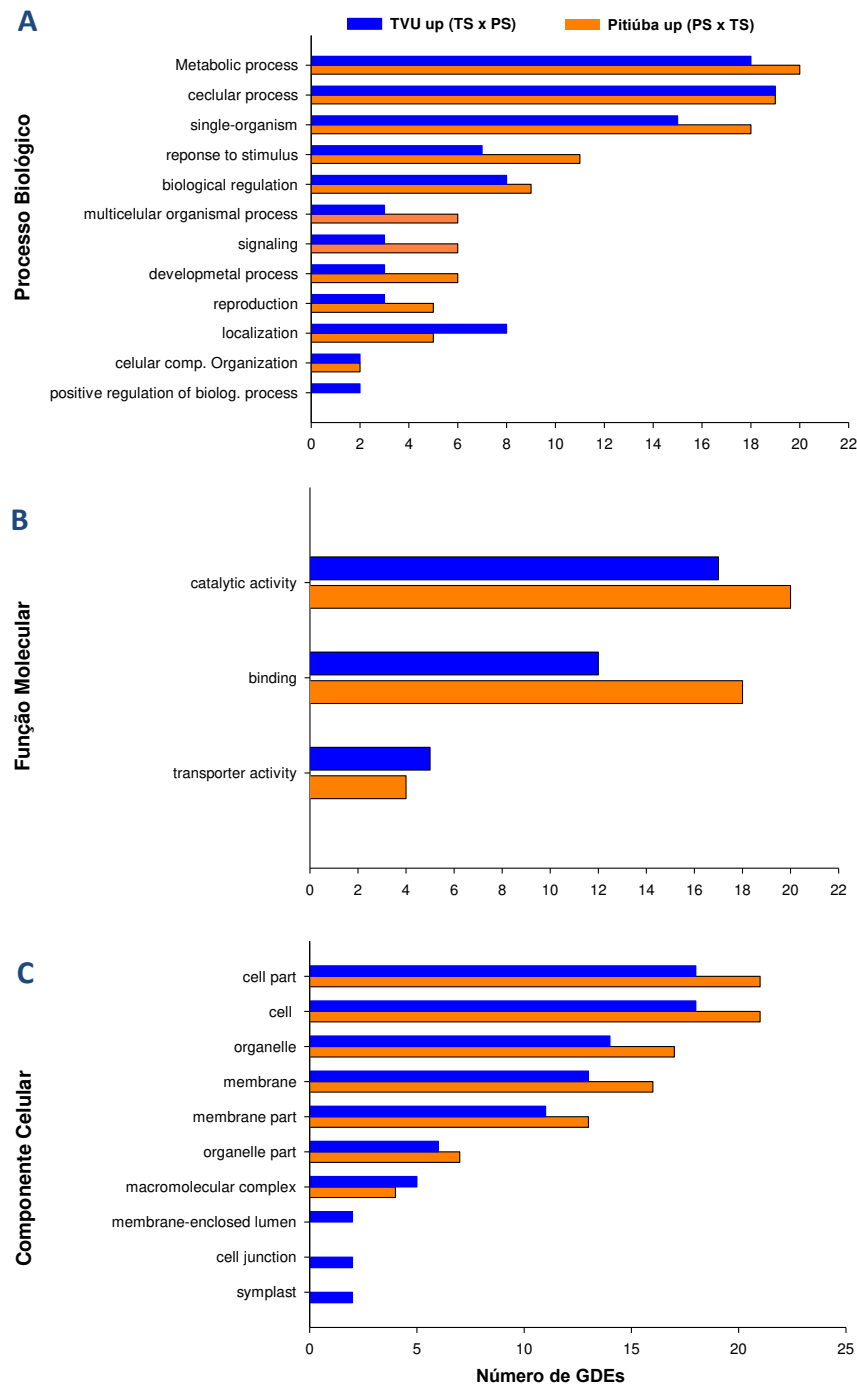
Na categoria função molecular, classe atividade catalítica, foi observado que plantas Pitiúba sob salinidade apresentaram maior número de genes regulados positivamente, enquanto o oposto foi registrado para o genótipo TVU (**Figura 15B**). Contudo, enquanto plantas estressadas TVU mostraram aumentos em um conjunto específico de genes de transportadores (*Cationic amino acid transporter 2, vacuolar*, ID – TR25904; e *Potassium transporter 2*, ID – TR33846) e de carreadores de elétrons (*Cytochrome c oxidase subunit 6b*, ID – TR7321), aquelas do genótipo Pitiúba apresentaram redução na expressão de genes que codificam bomba de prótons/transportadores (*ATPase subunit 6*, ID – TR43321; e *Outer envelope pore protein 16-3, chloroplast/mitochondrial*, ID – TR30443) e compostos antioxidantes (*Glutathione peroxidase 5*, ID – TR23676), quando comparadas aos respectivos controles (**Figura 15B**).

Quando os transcriptomas das plantas sob estresse foram confrontados, observou-se que os genótipos Pitiúba e TVU apresentaram modulação diferencial em genes específicos que compreendem as mesmas classes das categorias processo biológico, componente celular e função molecular (**Figura 20**). Em todos os casos, plantas do genótipo TVU mostraram um montante superior de genes com maior valor de expressão sob estresse salino, em comparação com plantas do genótipo Pitiúba, exceto para algumas classes.

Especificamente, plantas estressadas do genótipo Pitiúba exibiram maiores níveis de expressão de genes que codificam para o transportador ABC (TR44067) e para um grupo de moléculas de sinalização/resposta a estímulos (*Auxin-responsive protein IAA14*, ID - TR85880; *Calcium-dependent protein kinase 10*, ID – TR72474; Cullin-4, ID – TR4692; *GTP-binding protein*, ID – TR20751; *Mitogen-activated protein kinase kinase 9, MKK9*, ID – TR24001; *MLO-like protein 1*, ID – TR27541; e *Transcription factor TCP14*, ID – TR97109), dentre outros (*Catalase*, ID – TR85763; *Pentatricopeptide repeat-containing protein*, ID - TR19438; e *Phosphoglucomutase*, ID – TR25754) (**Figura 20 e Tabela S1**). Já os genes que codificam para uma proteína responsiva ao estresse (TR27726), peroxidase da glutatona (GPX, TR23676), transportadores de potássio (TR94988), helicase DEAD-box (TR41373), bem como genes específicos para moléculas de sinalização/resposta a estímulos (*Auxin response factor 2*, ID – TR27827; *Calcium-dependent protein kinase 10*, ID – TR72474; e *Metal tolerance protein 1*, ID – TR40523) e fatores de transcrição (*Transcription factor MYB1R1*, ID – TR1162; e *Transcription factor TCP14-like*, ID – TR97109) foram mais expressos nas folhas das plantas estressadas do genótipo TVU (**Figura 20 e Tabela S1**).

Vale ressaltar que, independente do estresse salino, do genótipo de *V. unguiculata* e do tempo de análise, foi observada uma regulação intensa na expressão de genes que codificam para intermediários metabólicos com função pouco conhecida nas rotas de defesa contra a salinidade. Tais genes estão listados na **Tabela S1**, seção OUTROS/HOMEOSTASE BIOQUÍMICA. Além disso, inúmeros genes ainda não caracterizados apresentaram variações extensivas na expressão (com valores variando entre 15 e 22 vezes, positivamente ou negativamente) em função dos tratamentos estudados, os quais estão descritos detalhadamente (número de acesso e *log2 fold change*) na seção DESCONHECIDOS/NÃO CARACTERIZADOS da **Tabela S1**.

Figura 20. Ontologia gênica (GO) dos genes diferencialmente expressos (GDEs) identificados na comparação Pitiúba Sal \times TVU Sal (PS \times TS), após 8 dias de estresse salino com NaCl a 100 mM. Os GDEs foram enquadrados nos termos processo biológico (A), componente celular (B) e função molecular (C). As barras representam o número de GDEs que apresentaram maiores níveis de expressão no genótipo TVU (TVU up) ou no genótipo Pitiúba (Pitiúba up) sob salinidade.



Fonte: elaborado pelo autor.

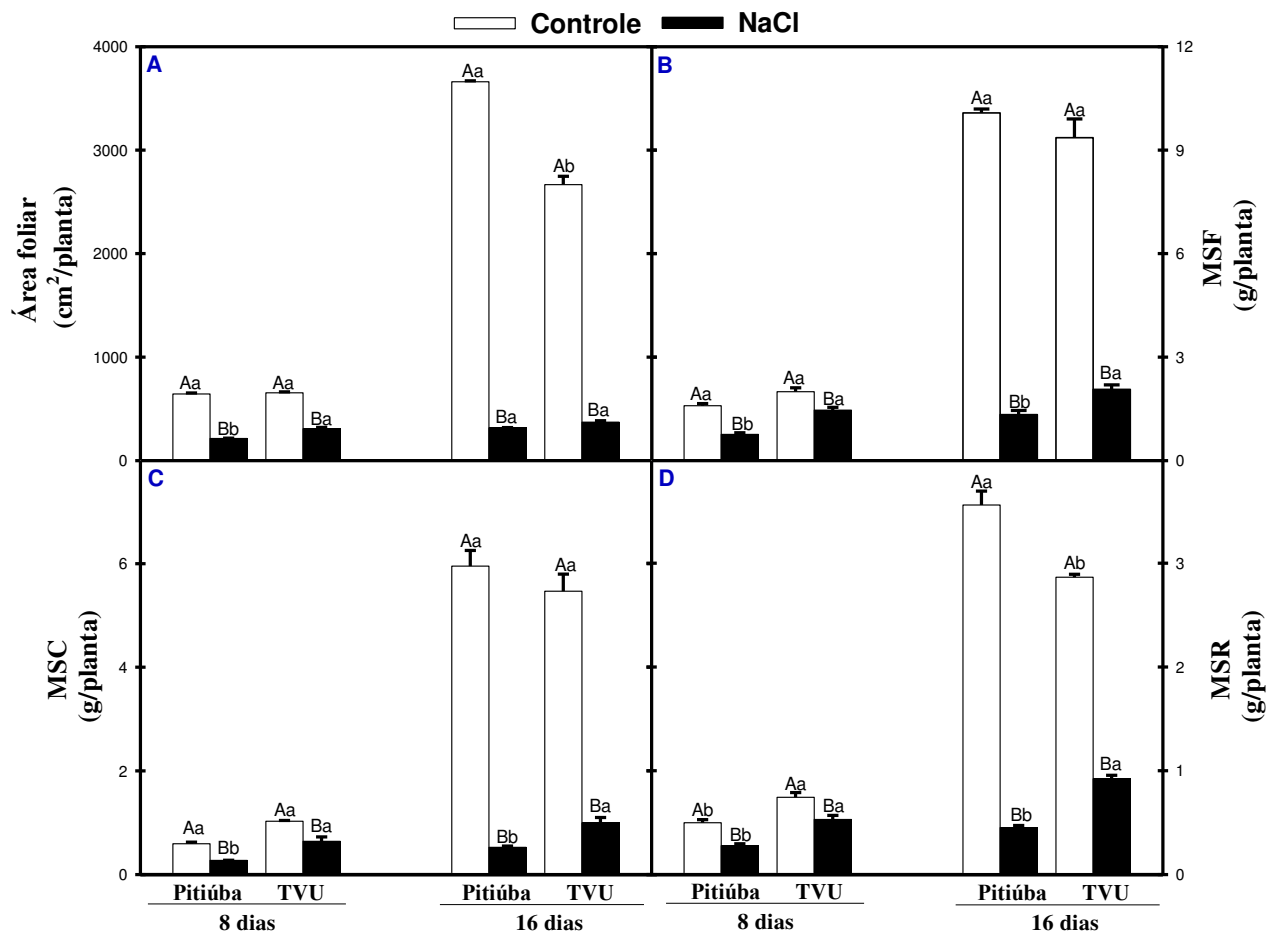
5.2 Análises Fisiológicas e Bioquímicas

5.2.1 Parâmetros de crescimento

Os dados de área foliar e massa seca são apresentados na **Figura 21**. Sob condições controle, plantas do genótipo TVU mostraram valores de área foliar menores que plantas do genótipo Pitiúba (**Figura 21A**). O estresse salino reduziu drasticamente a área foliar das plantas de feijão-caupi, independente do genótipo e do tempo de análise (**Figura 213A**). Contudo, os efeitos deletérios da salinidade foram mais acentuados nas plantas do genótipo Pitiúba, que apresentaram reduções de 67 e 91% aos 8 e 16 dias, respectivamente, enquanto que os decréscimos nas plantas do TVU foram de 53% e 86%, quando comparados com os respectivos controles.

Na ausência de estresse, a massa seca das folhas (**MSF**), caules (**MSC**) e raízes (**MSR**) foi similar em ambos os genótipos de feijão-caupi (**Figura 21**). Já sob salinidade, a produção de massa seca de todos os órgãos das plantas de caupi foi afetada severamente, sendo os efeitos menos drásticos no genótipo TVU (**Figura 21**). Nas folhas, plantas estressadas do genótipo Pitiúba apresentaram valores de massa seca 53 e 87% inferiores àqueles de plantas dos tratamentos controle, após 8 e 16 dias dos tratamentos salinos, respectivamente (**Figura 21B**). Em contraste, nos mesmos tempos de análise, plantas do genótipo TVU mostraram reduções de 23% e 79% em relação ao controle. Comportamento similar foi observado para os dados de crescimento dos caules (**Figura 21C**) e das raízes (**Figura 21D**). Além disso, em termos absolutos, os valores médios (nos dois tempos de análise) de **MSF**, **MSC** e **MSR** das plantas estressadas do genótipo TVU foram 64, 114 e 102% superiores aos de plantas do genótipo Pitiúba, respectivamente.

Figura 21. Área foliar (A) e Massas secas das folhas (B), caule (C) e raízes (D) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse). No mesmo tempo de análise, dentro do mesmo genótipo, colunas seguidas por letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas em função dos tratamentos salinos (Controle × NaCl); ao passo que, no mesmo tratamento de estresse, letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas em função do genótipo (Pitiúba × TVU), de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados representam a média de três repetições \pm erro padrão.



Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.2 Eficiência da maquinaria fotossintética

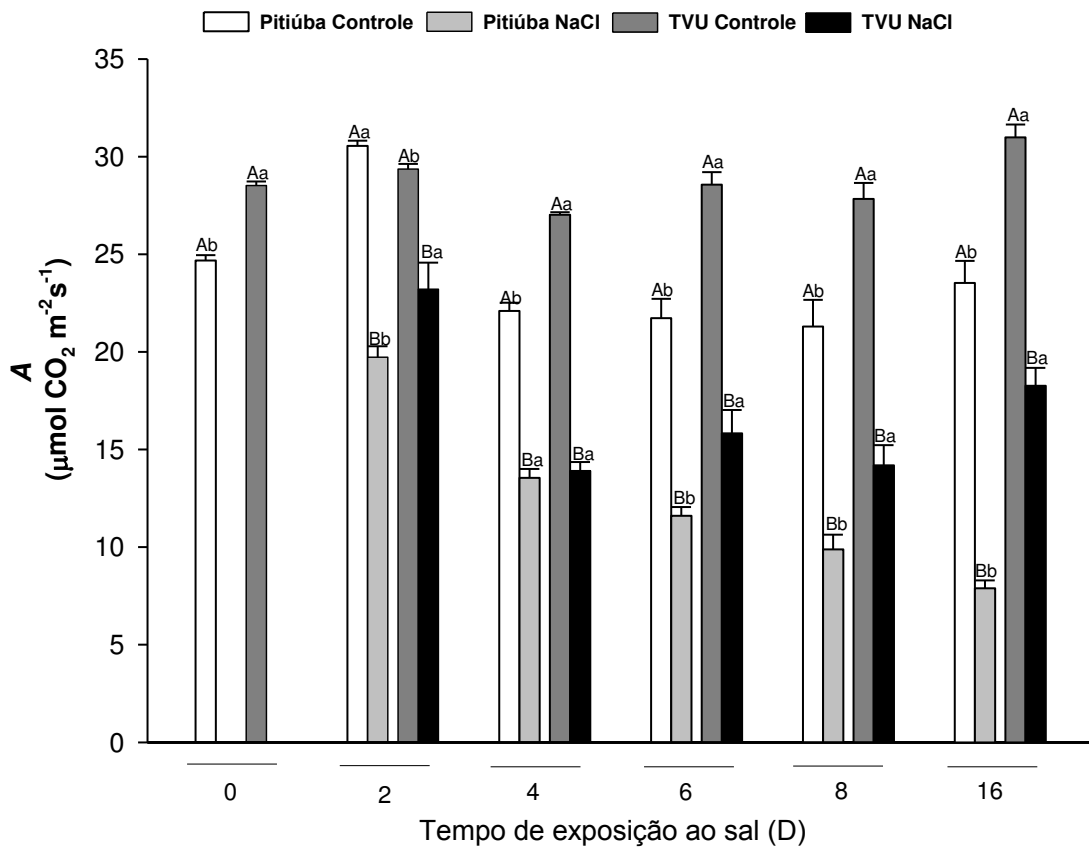
No presente estudo, os dados de trocas gasosas e os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* das plantas de feijão foram analisados em diferentes tempos ao longo de 16 dias de exposição ao NaCl (**Figuras 22 a 27**). Na ausência de estresse, as taxas de assimilação de CO₂ (**A**) foram maiores nas plantas do genótipo TVU em comparação ao Pitiúba, exceto no segundo tempo de análise (**Figura 22**). Em ambos os genótipos, decréscimos significativos nas taxas de **A** foram observados logo após a imposição do estresse salino, os quais foram progredindo com o andamento do experimento. Contudo, os efeitos deletérios da salinidade nas taxas fotossintéticas foram mais acentuados nas plantas do genótipo Pitiúba, que apresentaram reduções de 34, 37, 48, 55 e 66% nos tempos 2, 4, 6, 8 e 16 dias, respectivamente. Já as reduções nas taxas de **A** das plantas do genótipo TVU foram de 25, 48, 37, 49 e 40% após 2, 4, 6, 8 e 16 dias, respectivamente (**Figura 22**). Além disso, após 6, 8 e 16 dias de exposição ao NaCl, os valores de **A** das plantas estressadas do genótipo TVU foram, respectivamente, 53, 43 e 131% maiores que aqueles das plantas estressadas do genótipo Pitiúba.

Sob condições controle, de maneira geral, as taxas de condutância estomática (**gs**) e transpiração (**E**) apresentaram valores similares em ambos os genótipos de feijão-caupi, ao longo de todo período experimental (**Figura 23**). O estresse salino reduziu significativamente as taxas de **gs** e **E**, independente do genótipo de feijão e do tempo de análise; entretanto, as reduções foram mais conspícuas nas plantas do genótipo Pitiúba. Além disso, na presença de NaCl, a condutância estomática e a transpiração das plantas Pitiúba foram inferiores àquelas das plantas TVU (**Figura 23**).

De modo geral, as concentrações internas de CO₂ (**Ci**) apresentaram valores semelhantes nas plantas de feijão, tanto na presença como na ausência de sal, exceto no último tempo de análise (**Figura 24A**). O estresse salino reduziu significativamente a **Ci** em ambos os genótipos, com maiores decréscimos aos 2 dias de exposição ao sal (reduções médias de 31%) (**Figura 24A**); exceto para plantas do genótipo pitiúba, que, após 16 dias de estresse, apresentaram incrementos nas concentrações internas de CO₂ em relação ao controle. Na ausência de estresse, a eficiência da carboxilação da rubisco (**A/Ci**) foi menor nas plantas do genótipo Pitiúba, com exceção do segundo tempo analisado (**Figura 24B**). Com a salinidade, alterações na **A/Ci** só foram evidentes após quatro dias de estresse, com

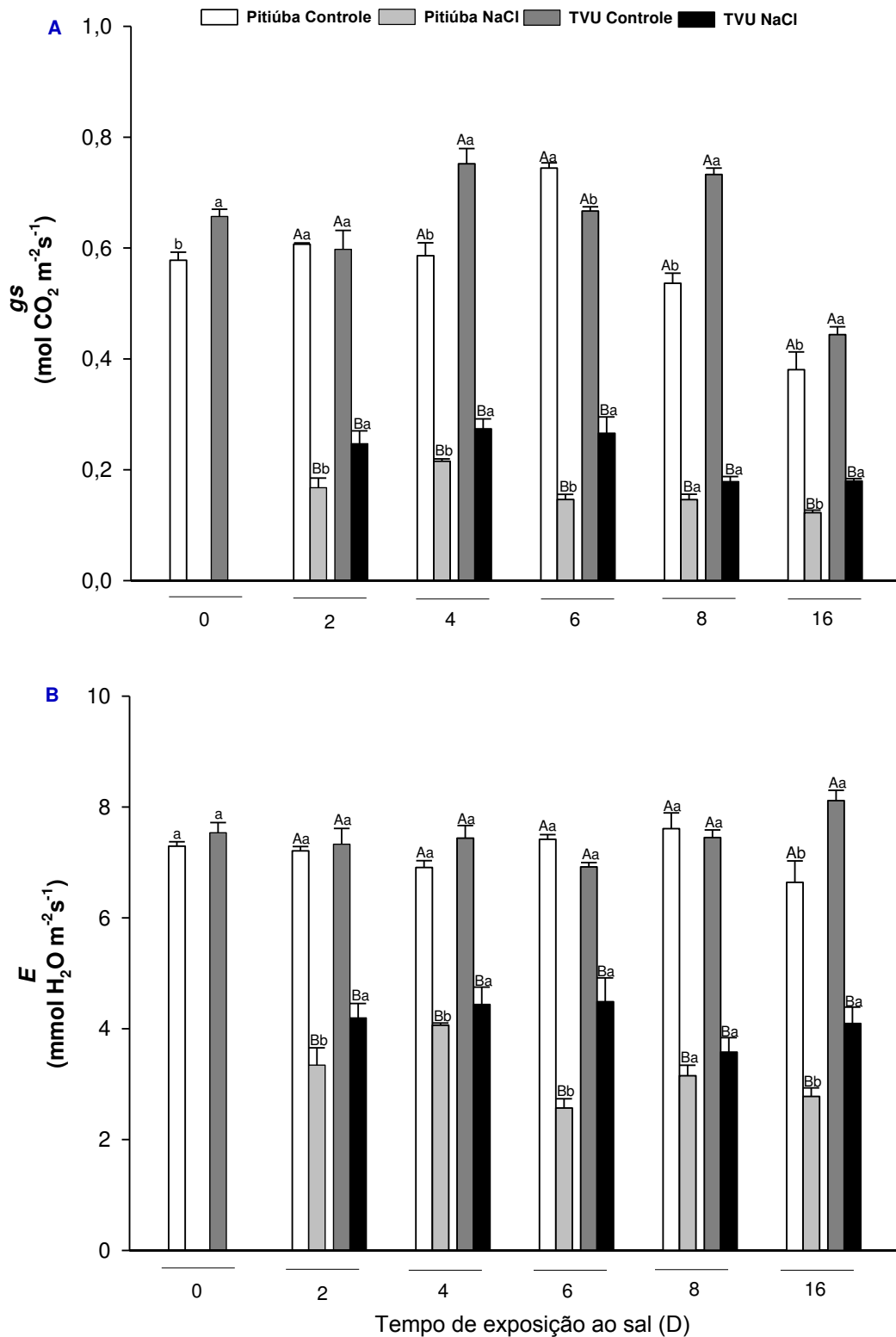
decréscimos significativos em ambos os genótipos de feijão. Entretanto, sob condições de estresse, os valores de A/C_i das plantas TVU foram 27, 39 e 200% superiores àqueles das plantas Pitiúba, nos tempos 6, 8 e 16 dias, respectivamente.

Figura 22. Fotossíntese líquida (A) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse). No mesmo tempo de análise, dentro do mesmo genótipo, colunas seguidas por letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas em função dos tratamentos salinos (Controle \times NaCl); ao passo que, no mesmo tratamento de estresse, letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas em função do genótipo (Pitiúba \times TVU), de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os dados representam a média de três repetições \pm erro padrão.



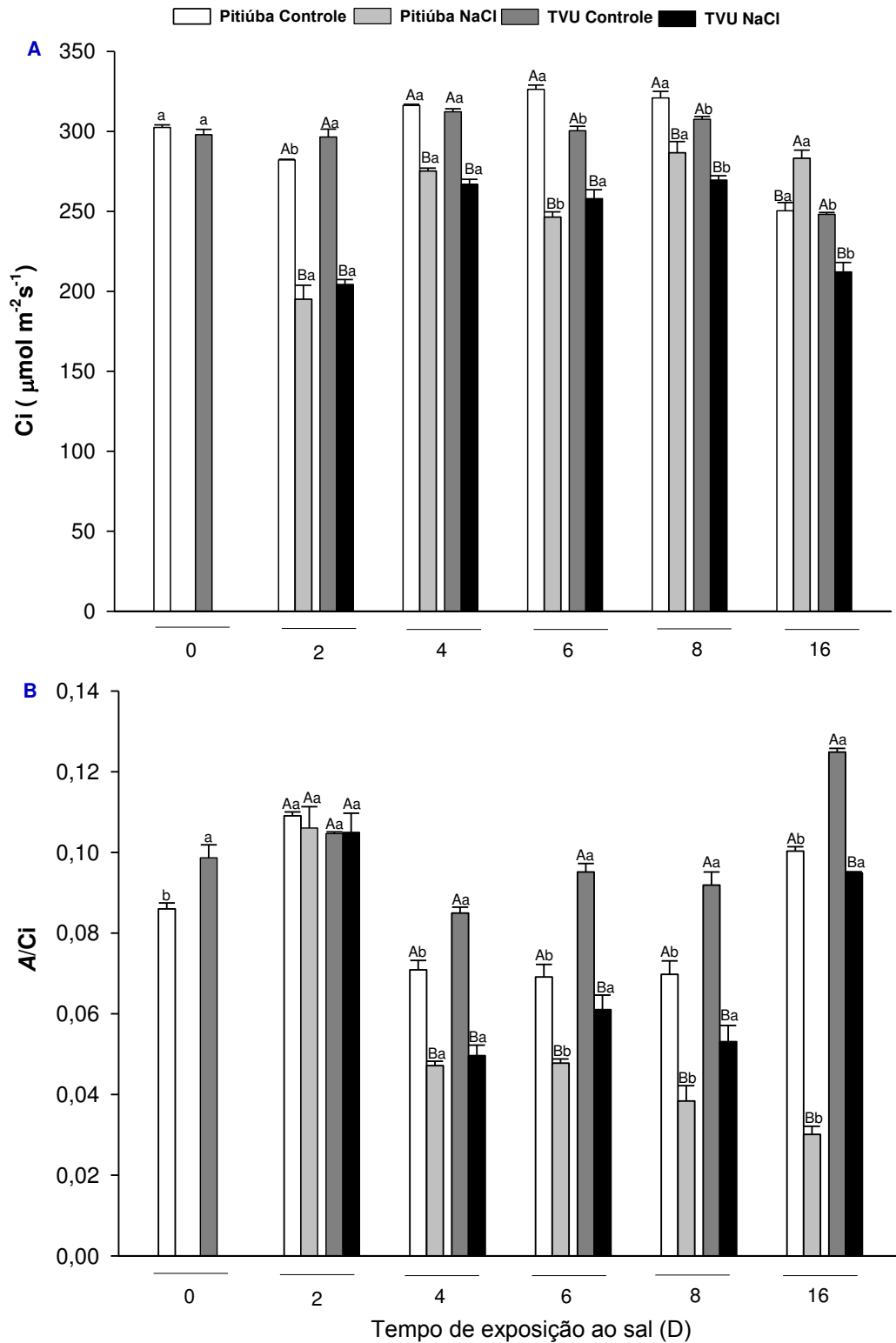
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 23. Taxas de condutância estomática (g_s) (A) e transpiração (E) (B) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse). Detalhes estatísticos similares aos descritos na figura 3.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 24. Concentrações internas de CO_2 (C_i) (A) e eficiência de carboxilação da Rubisco (A/C_i) (B) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse). Detalhes estatísticos similares aos descritos na figura 3.

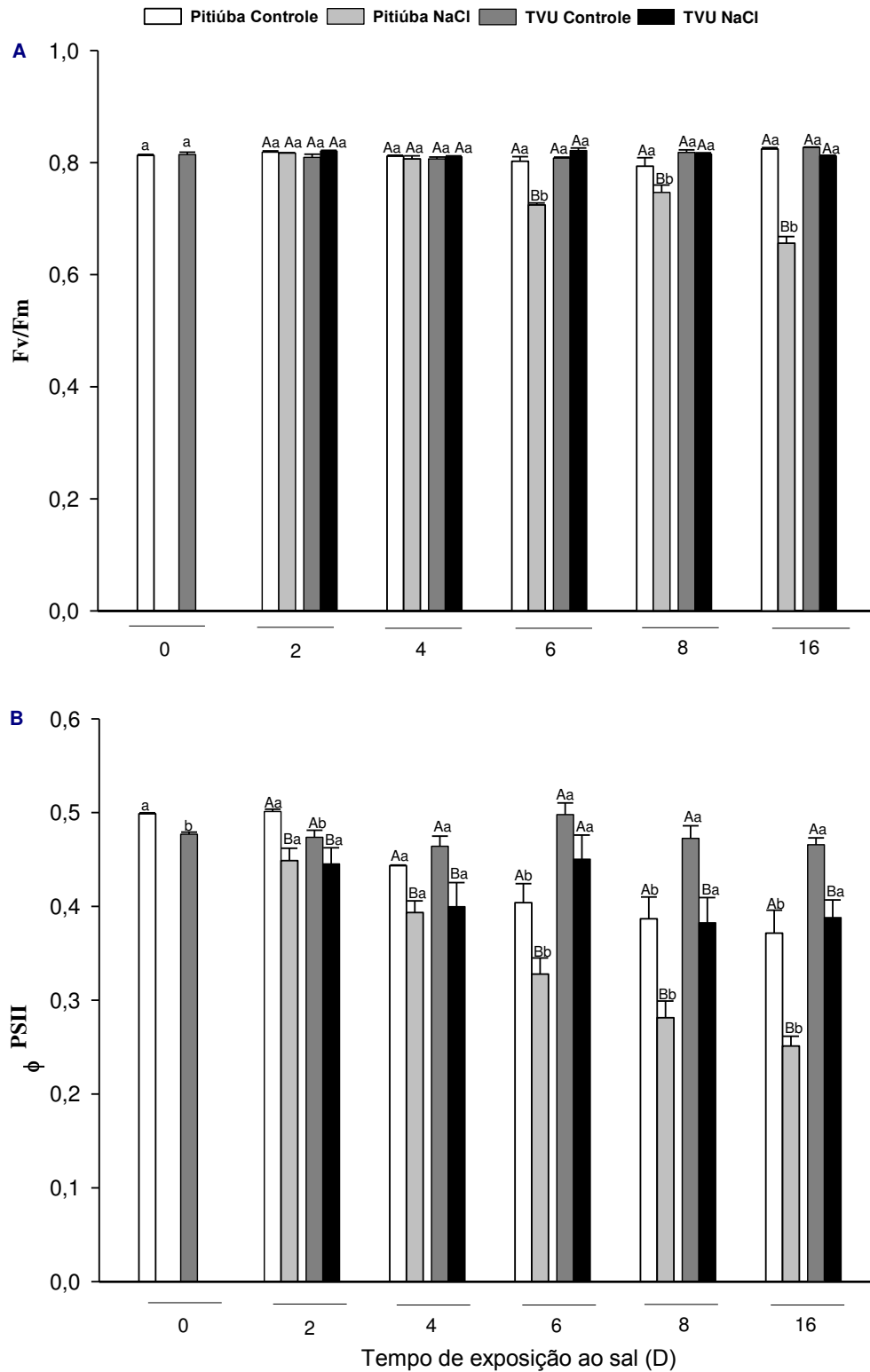


Fonte: elaborado pelo autor.

Os resultados da eficiência fotoquímica do PSII são mostrados nas **Figuras 25 a 27**. Sob condições controle, a eficiência quântica máxima do PSII (**Fv/Fm**) apresentou valores similares nas plantas de feijão-caupi, ao longo de todo o experimento (**Figura 25A**). Já sob salinidade, decréscimos significativos na relação **Fv/Fm** foram registrados inicialmente nas plantas Pitiúba que, nos tempos 6, 8 e 16, apresentaram valores 9,7, 7,4 e 20,4% menores que aqueles dos respectivos controles. Em contraste, a eficiência quântica máxima do PSII das plantas TVU não foi afetada com a exposição ao NaCl, com reduções não significativas em relação ao controle (**Figura 25A**).

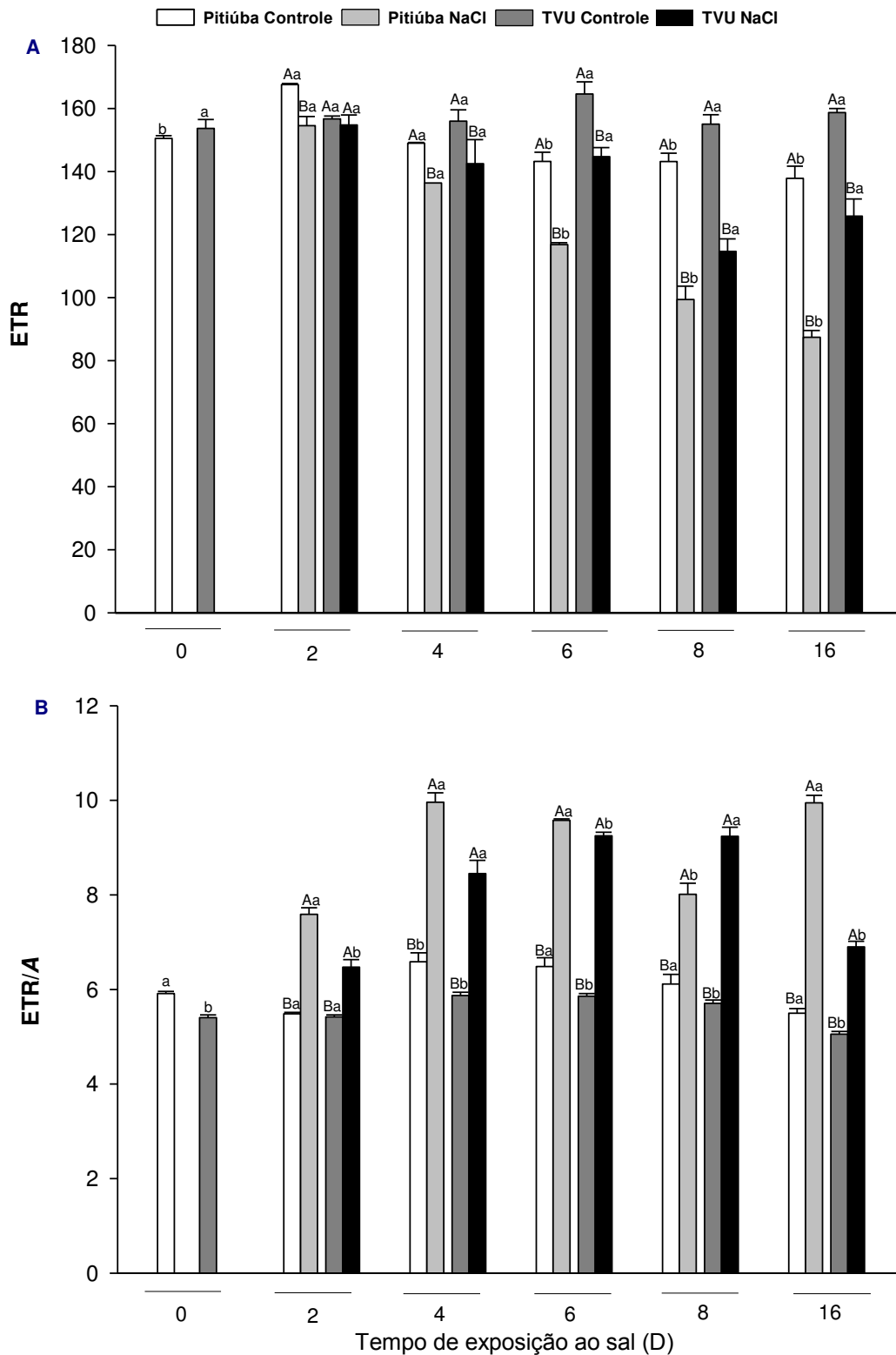
No presente estudo, a modulação da eficiência quântica efetiva do PSII (ϕ PSII) e da taxa de transporte de elétrons (ETR) foi similar entre os genótipos de feijão, tanto na ausência como na presença de estresse (**Figuras 25B e 26A**). Ambos os parâmetros foram afetados negativamente logo após a imposição do tratamento salino; contudo, com o andamento do estresse, os efeitos foram mais severos nas plantas do genótipo pitiúba. Nos tempos 6, 8 e 16 dias, plantas Pitiúba apresentaram valores de ϕ PSII 17, 28 e 36% menores que os do tratamento controle, respectivamente; enquanto plantas TVU apresentaram decréscimos de apenas 9,6, 19 e 17% (**Figura 25B**). Além disso, nesses mesmos tempos de análise, plantas estressadas do genótipo TVU mostraram valores de ϕ PSII muito superiores àqueles do genótipo Pitiúba (**Figura 25B**). Comportamento semelhante foi observado para a taxa de transporte de elétrons (ETR), sendo observado melhor desempenho das plantas TVU sob estresse salino (**Figura 26A**). Já a relação ETR/A foi aumentada significativamente nas plantas estressadas de ambos os genótipos, porém, os incrementos foram maiores nas plantas do genótipo Pitiúba, exceto para o tempo de 8 dias (**Figura 26B**).

Figura 25. Eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) (**A**) e Eficiência quântica efetiva do PSII (Φ_{PSII}) (**B**) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse). Detalhes estatísticos similares aos descritos na figura 3.



Fonte: elaborado pelo autor.

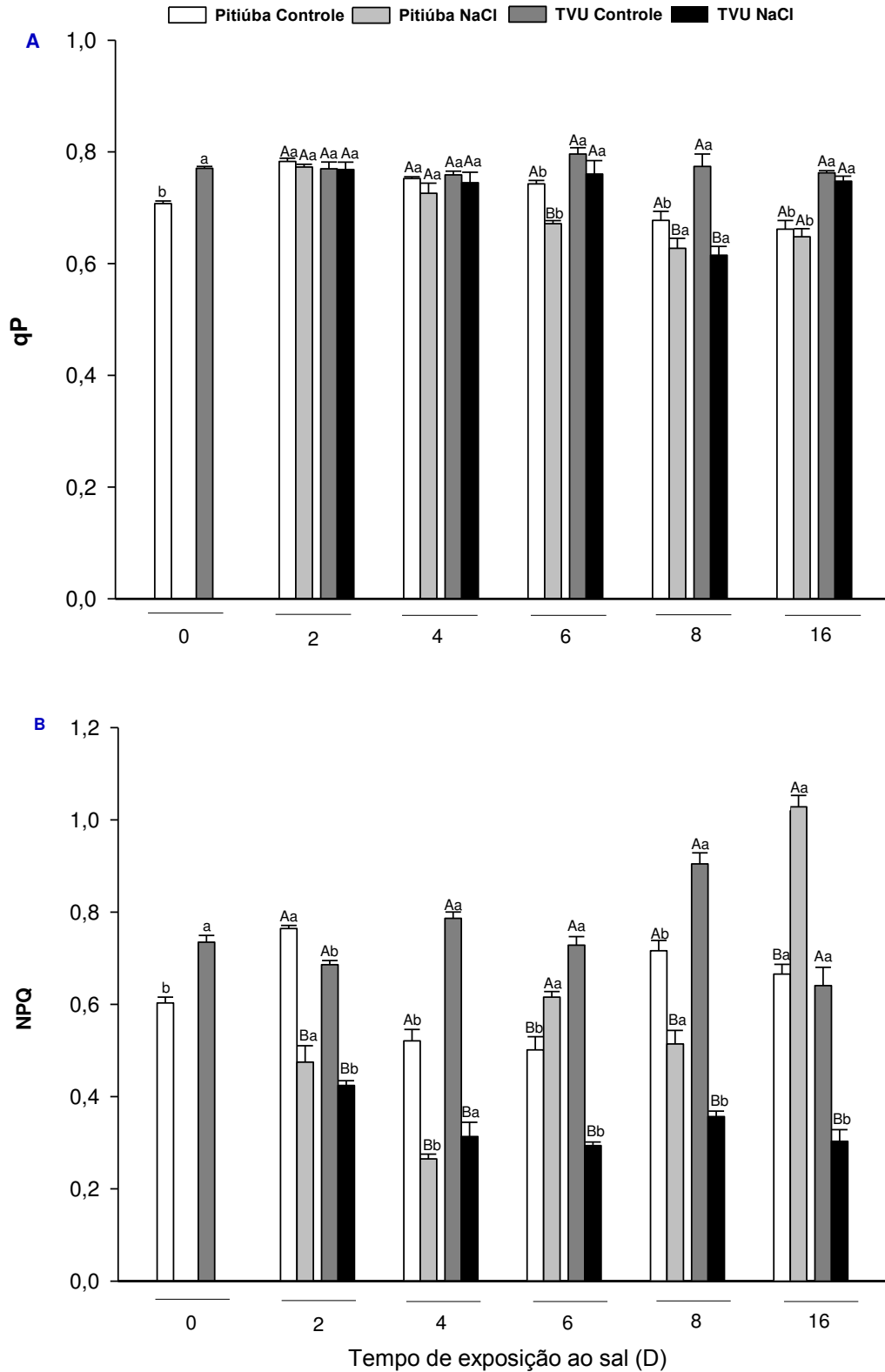
Figura 26. Taxa de transporte de elétrons (ETR) (A) e Indicativo de dreno alternativo de elétrons (ETR/A) (B) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse). Detalhes estatísticos similares aos descritos na figura 3.



Fonte: elaborado pelo autor.

No genótipo pitiúba, o coeficiente de dissipação fotoquímica (**qP**) foi afetado negativamente pela salinidade após 6 e 8 dias dos tratamentos de estresse, ao passo que, para o genótipo TVU, esse fenômeno foi observado apenas no oitavo dia do experimento, em relação ao respectivo controle (**Figura 27A**). Por outro lado, o coeficiente de dissipação não fotoquímica (**NPQ**) foi modulado diferencialmente dependendo do genótipo, do tratamento de estresse e do tempo analisado (**Figura 27B**). Sob condições controle, plantas do genótipo TVU apresentaram valores de **NPQ** maiores do que plantas Pitiúba, exceto nos tempos de coleta 2 e 16. Com o estresse, plantas do genótipo TVU mostraram decréscimos significativos na dissipação não fotoquímica em comparação ao controle, em todos os pontos de tempos analisados; enquanto que o genótipo Pitiúba apresentou reduções nos tempos 2, 4 e 8, e incrementos após 6 e 16 dias de estresse salino (**Figura 27B**).

Figura 27. Coeficiente de dissipação fotoquímica (qP- **A**) e coeficiente de dissipação não fotoquímica (NPQ -**B**) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse). Detalhes estatísticos similares aos descritos na figura 3.



Fonte: elaborado pelo autor.

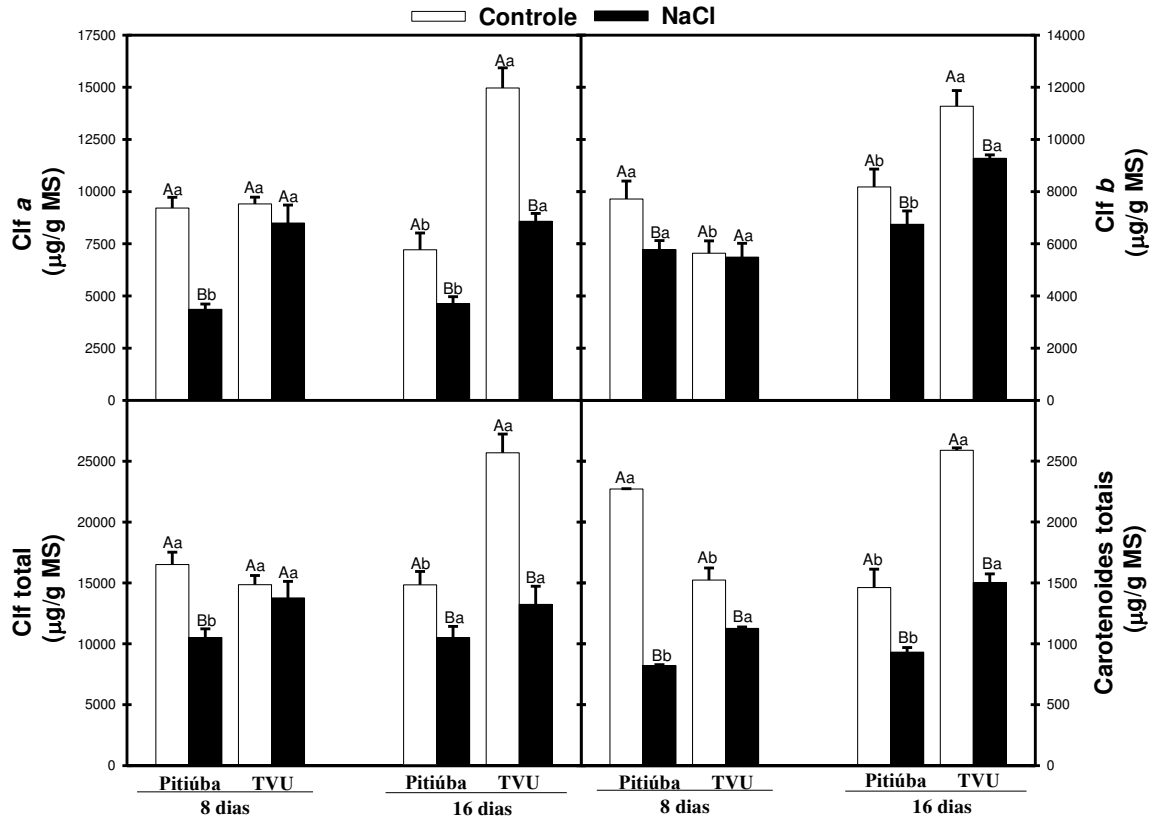
5.3 Pigmentos Fotossintéticos

Na ausência de estresse, no primeiro tempo de análise (8 dias), os teores de clorofila a (Clf *a*) e total (Clf *total*) foram similares em ambos os genótipos de feijão, ao passo que os de clorofila b (Clf *b*) e de carotenoides foram maiores nas plantas do genótipo Pitiúba (**Figura 28**). Já no segundo tempo de análise (16 dias), os teores dos pigmentos fotossintéticos das plantas do genótipo TVU foram maiores que àqueles do genótipo Pitiúba.

Com o estresse salino, plantas do genótipo Pitiúba mostraram reduções médias (nos dois tempos de análise) de 44, 22, 30 e 56% nos teores de Clf *a*, Clf *b*, Clf *total* e carotenoides, respectivamente, em relação ao controle. Por outro lado, com exceção dos carotenóides (**Figura 28D**), plantas do genótipo TVU apresentaram teores de pigmentos fotossintéticos inalterados após oito dias da aplicação dos tratamentos salinos. Contudo, após 16 dias da imposição do estresse, os teores de Clf *a*, Clf *b*, Clf *total* e carotenoides das plantas TVU sofreram reduções de 31, 18, 39 e 35%, respectivamente, em comparação com plantas controle.

Vale ressaltar que, na presença de NaCl, as concentrações dos pigmentos fotossintéticos das plantas estressadas do genótipo TVU foram maiores que àquelas do genótipo Pitiúba, exceto para a Clf *b* no tempo de 8 dias (**Figura 28**).

Figura 28. Teores de clorofila a (A), b (B) e total (C) e de carotenoides (D) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse). Detalhes estatísticos similares aos descritos na figura 3.

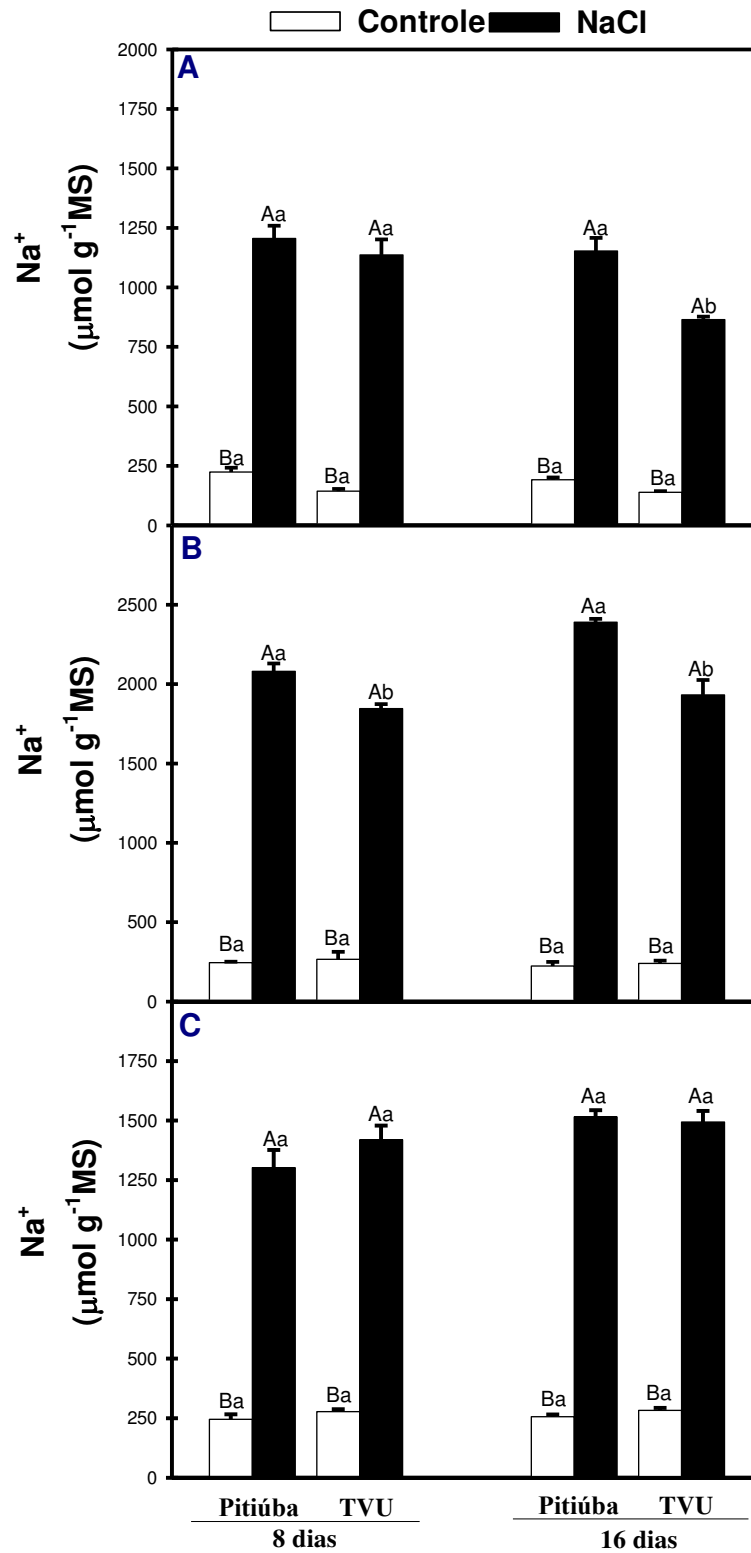


Fonte: elaborado pelo autor.

5.4 Homeostase iônica

Os dados dos íons K^+ e Na^+ e relação K^+/Na^+ determinados nas folhas, caules e raízes das plantas de *V. unguiculata* são apresentados nas **Figuras 29, 30 e 31**. De maneira geral, os teores de K^+ nas folhas do genótipo TVU foram menos afetados pelo estresse salino em comparação ao genótipo Pitiúba, com decréscimos somente após 16 dias de tratamento (**Figura 29**). De forma semelhante, após a imposição do estresse salino nas raízes os teores de K^+ do genótipo Pitiúba foram reduzidos significativamente em ambos os tempos analisados, enquanto no genótipo TVU só foram observados decréscimos após 16 dias de estresse (**Figura 29A e C**). Por outro lado, nos caules, o estresse salino promoveu reduções nos teores desse íon em ambos os genótipos, independente do tempo de coleta (**Figura 29B**).

Figura 29. Teores de K^+ nas folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse). Detalhes estatísticos similares aos descritos na figura 3.

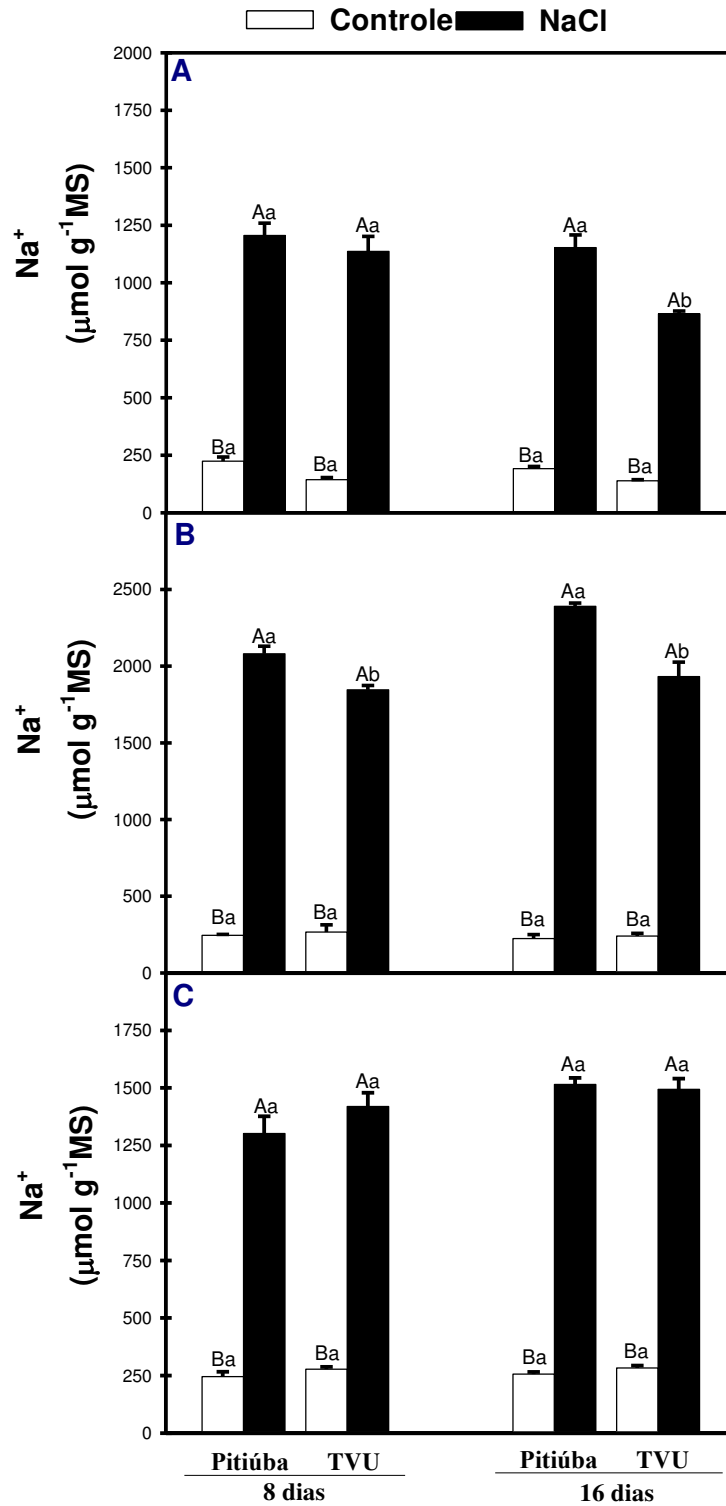


Fonte: elaborado pelo autor.

Sob condições controle, o acúmulo de Na^+ foi similar nos diferentes órgãos das plantas de ambos os genótipos de *V. unguiculata* (**Figura 30**). O estresse salino aumentou consideravelmente o acúmulo desse íon em todos os órgãos das plantas em relação ao controle, independente do genótipo e do tempo de análise. Entretanto, houve um acúmulo diferencial de Na^+ nos tecidos das plantas de feijão sob salinidade. Nas folhas, no segundo tempo de análise (16 dias), plantas do genótipo Pitiúba apresentaram teores de Na^+ 28% maiores que aqueles do genótipo TVU (**Figura 30A**). Similarmente, nos caules, um maior acúmulo desse íon tóxico foi observado no genótipo Pitiúba sob estresse, com valores 13 e 24% superiores àqueles do genótipo TVU, nos tempos 8 e 16 dias, respectivamente (**Figura 30B**). As raízes, por sua vez, apresentaram concentrações de Na^+ similares nas plantas estressadas dos dois genótipos de feijão (**Figura 30C**).

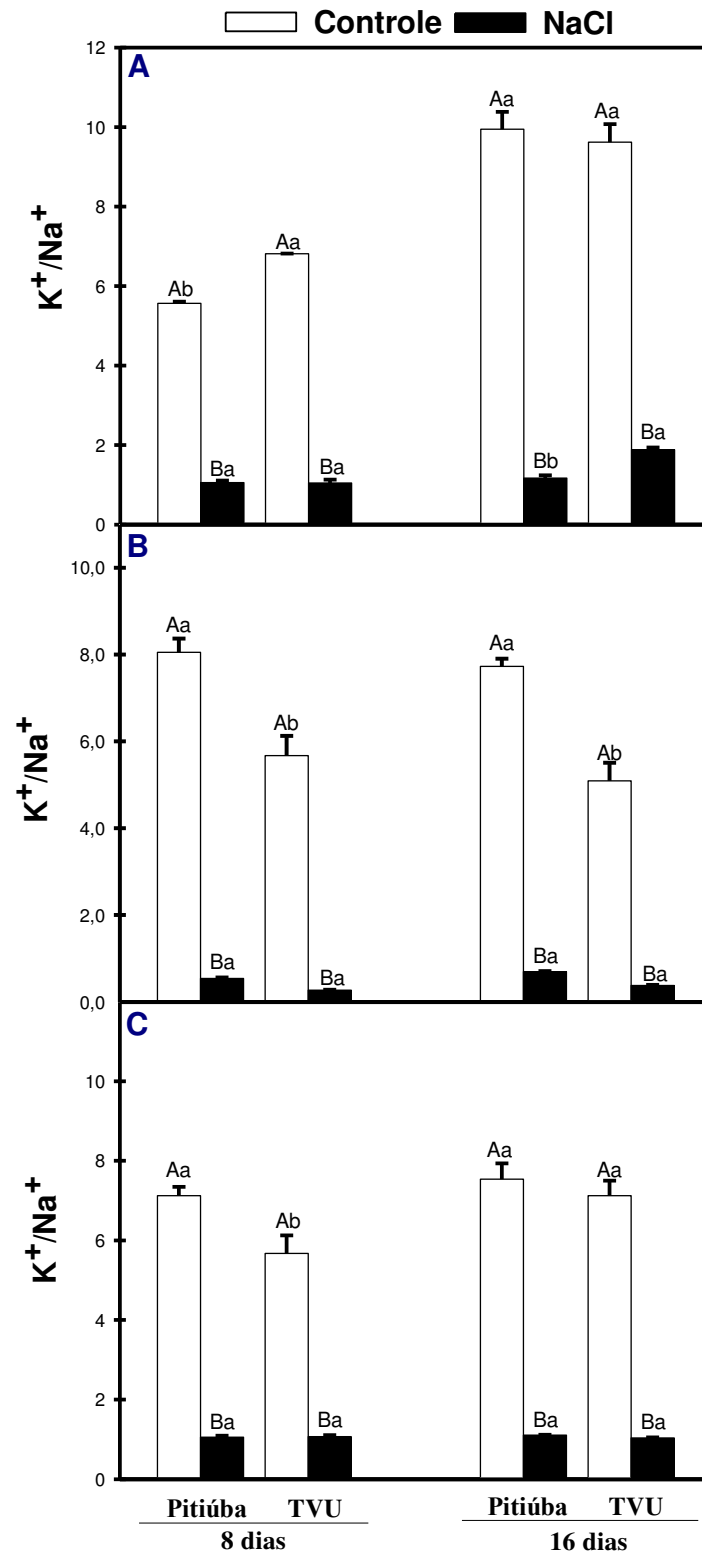
No primeiro tempo de análise (8 dias), a relação K^+/Na^+ nas folhas foi maior no genótipo TVU crescendo na ausência de NaCl , enquanto o oposto foi observado para os caules e raízes (**Figura 31**). Já na segunda coleta, apenas a relação K^+/Na^+ dos caules apresentou diferenças significativas entre os genótipos, sendo os maiores valores registrados nas plantas Pitiúba. Sob salinidade, a relação K^+/Na^+ diminuiu fortemente nos órgãos das plantas de ambos os genótipos; contudo, nos tecidos foliares das plantas sob estresse, uma maior relação K^+/Na^+ foi observada no genótipo TVU em relação ao Pitiúba (**Figura 31**).

Figura 30. Teores de Na^+ em folhas (A), caule (B) e raízes (C) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse). Detalhes estatísticos similares aos descritos na figura 3.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 31. Relação K^+ / Na^+ em folhas (A), caule (B) e raízes (C) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse). Detalhes estatísticos similares aos descritos na figura 3.

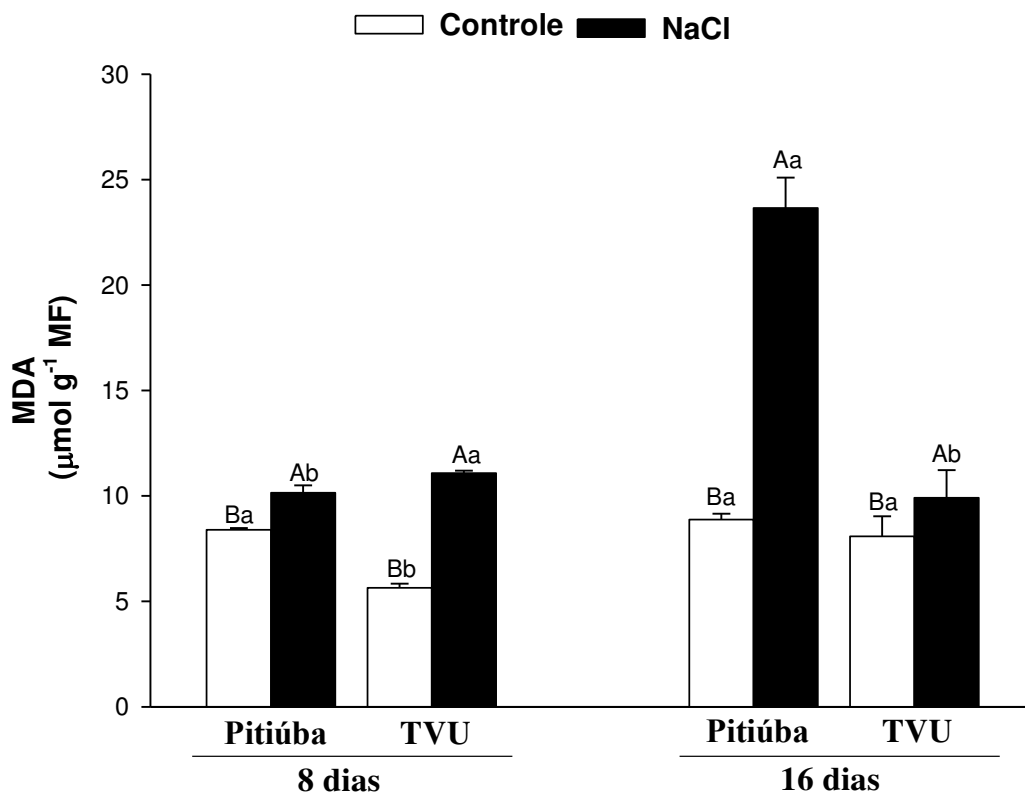


Fonte: elaborado pelo autor.

5.5 Danos oxidativos e sistema antioxidante

A **Figura 32** apresenta os resultados dos danos oxidativos (estimativa da peroxidação de lipídeos de membranas pelo MDA) nas folhas das plantas de *V. unguiculata*. Sob condições controle, os teores de MDA apresentaram valores semelhantes nos genótipos Pitiúba e TVU, em ambos os tempos de coleta. Quando expostas ao estresse salino, plantas de *V. unguiculata* apresentaram aumentos significativos nos teores de MDA, indicando que ocorreram danos oxidativos nas membranas celulares (**Figura 32**). Convém salientar que, após 16 dias de tratamento salino, os teores de MDA das plantas do genótipo Pitiúba foram muito maiores (\uparrow 58%) do que aqueles das plantas do genótipo TVU.

Figura 32. Teores de malondialdeído (MDA) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse). Detalhes estatísticos similares aos descritos na figura 3.

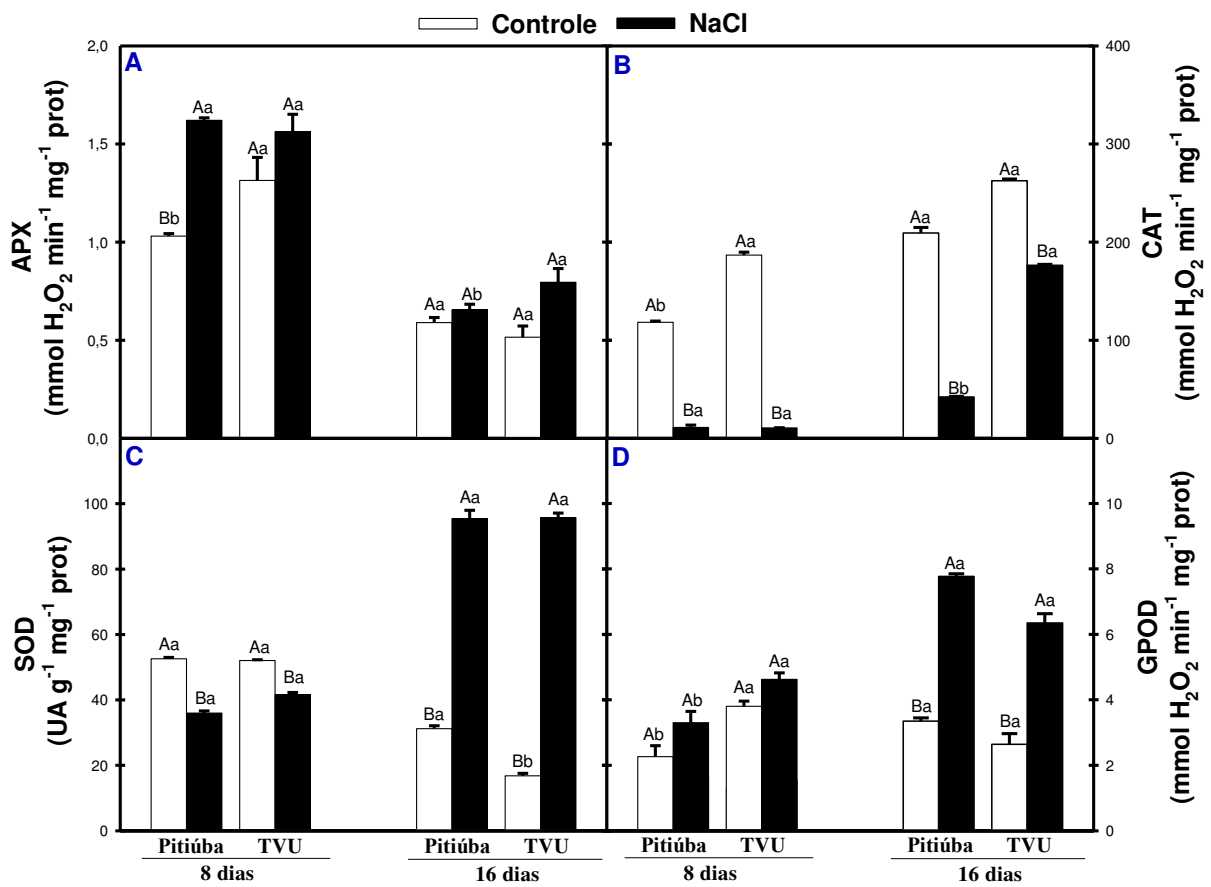


Fonte: elaborado pelo autor.

Os resultados da atividade das enzimas antioxidantes são mostrados na **Figura 33**. De modo geral, na primeira coleta (8 dias), as maiores atividades das enzimas peroxidase do ascorbato (**APX**), catalase (**CAT**), dismutase do superóxido (**SOD**) e peroxidase do guaiacol (**GPX**) foram encontradas em plantas do genótipo TVU crescendo na ausência de sais; ao passo que nenhuma diferença significativa foi detectada no segundo tempo (16 dias) de análise. Em relação à enzima **APX**, no oitavo dia dos tratamentos, houve incremento em sua atividade no grupo tratado com NaCl a 100 mM do genótipo Pitiúba em relação ao respectivo controle, sem haver, contudo, diferença significativa entre as plantas estressadas de ambos os genótipos (**Figura 15A**). Já aos 16 dias, alterações na atividade da **APX** pelo estresse salino foram registradas apenas nas plantas do genótipo TVU, com incrementos de 54% em comparação ao controle (**Figura 33A**).

De modo inesperado, plantas de ambos os genótipos mostraram reduções na atividade da **CAT** quando expostas à salinidade, com os maiores decréscimos no primeiro tempo de análise (**Figura 33B**). Mesmo assim, aos 16 dias de estresse, os valores de atividade da **CAT** das plantas do genótipo TVU foram 318% maiores que aqueles do genótipo Pitiúba (**Figura 33B**). Contrariamente, durante o período experimental analisado, a **SOD** apresentou atividade maior nas folhas das plantas estressadas em comparação com plantas controle; porém não houve diferença significativa entre os diferentes genótipos de *V. unguiculata* crescendo na presença de estresse salino (**Figura 33C**). Já a atividade da **GPX** só foi influenciada pelo estresse salino no segundo tempo de análise (16 dias), com aumentos de 131 e 121% nas plantas do genótipo Pitiúba e TVU, em relação aos respectivos controles (**Figura 33D**).

Figura 33. Atividade das enzimas peroxidase do ascorbato (APX, **A**), catalase (CAT, **B**), dismutase do superóxido (SOD, **C**) e peroxidase do guaiacol (GPX, **D**) de plantas de feijão-caupi, genótipos pitiúba e TVU 2331, cultivadas em soluções nutritivas na ausência (controle) e presença de NaCl a 100 mM (estresse). Detalhes estatísticos similares aos descritos na figura 3.



Fonte: elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi conduzida uma investigação comparativa do transcriptoma e das respostas fisiológicas e bioquímicas de dois genótipos de *V. unguiculata* submetidos ao estresse salino, buscando elucidar mecanismos de tolerância a esse estresse.

6.1 A produção de biomassa sob salinidade depende do genótipo de *V. unguiculata* e do tempo de estresse

A inibição do crescimento e desenvolvimento das plantas pelo estresse salino tem sido um fenômeno frequentemente relatado para várias espécies de plantas glicófitas (HORIE *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2014; GHOSH *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016). Nesse contexto, a produção de biomassa se torna um importante parâmetro para avaliar a capacidade das plantas para tolerar e manter o crescimento sob condições ambientais estressantes (MUNNS; TESTER, 2008; NEGRÃO *et al.*, 2017).

No presente estudo, o estresse salino promoveu reduções drásticas no crescimento das plantas de ambos os genótipos de *V. unguiculata*; contudo, uma maior produção de biomassa foi observada nas plantas do genótipo TVU (**Figura 21**). Em outras palavras, o genótipo TVU se mostrou mais tolerante ao estresse salino que o genótipo pitiúba, dados os maiores índices de AF, MSF, MSC e MRS. Por outro lado, plantas do genótipo Pitiúba apresentaram alta sensibilidade ao excesso de sais, com maiores reduções tanto área foliar como na produção de massa seca dos tecidos, sendo os efeitos mais proeminentes aos 16 dias de tratamento salino.

Estudos anteriores com os genótipos Pitiúba apresentaram resultados controversos em relação a aclimação de plantas de *V. unguiculata* ao estresse salino, pois enquanto alguns reportaram que plantas do genótipo Pitiúba apresentam maior tolerância à salinidade que àquelas do genótipo TVU (COSTA *et al.*, 2003) outros estudos observaram que Pitiúba tem maior sensibilidade à salinidade (MAIA *et al.*, 2012). Essa discrepância na literatura pode ser resultado de diversos fatores, incluindo o tempo de submissão ao estresse (variação de 14 a 33 dias), concentração dos sais (25 e 100 mM de NaCl), bem como das variações nas condições ambientais em que os experimentos foram implementados.

Inúmeros estudos demonstraram que a restrição do crescimento é um dos principais efeitos da salinidade. Alguns autores consideram a redução na área foliar das plantas um mecanismo de adaptação à salinidade, pois resulta em uma menor área para transpiração

(SINGH *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016; NEGRÃO *et al.*, 2017). Entretanto, esse tipo de mecanismo é preponderante apenas quando as plantas são expostas simultaneamente a episódios de salinidade e déficit hídrico, e pode não ser válido para todas as condições de estresse (PRISCO; GOMES-FILHO; MIRANDA, 2016). No presente estudo, é provável que a redução da área foliar tenha ocorrido em função dos efeitos tóxicos da salinidade sobre a fisiologia e bioquímica das plantas de feijão, o que resultou em danos severos aos processos de crescimento (**Figura 21**). Essa hipótese é apoiada pelos achados obtidos em diversos estudos, incluindo aqueles realizados com plantas de arroz (OMISUM *et al.*, 2017), soja (LIU *et al.*, 2017), trigo (SIDDIQUI *et al.*, 2017), milho (PANDOLFI *et al.*, 2016) e feijão (KANDIL; SHAREIF; GAD, 2017).

6.2. A maior tolerância ao estresse salino do genótipo TVU é associada diretamente a alta eficiência da maquinaria fotossintética

Dentre os processos fisiológicos afetados negativamente pelo estresse salino destaca-se a fotossíntese, um marcador de tolerância a estresses abióticos para diversas espécies de plantas (HANIN *et al.*, 2016, SUO *et al.*, 2017). No presente estudo, o estresse salino reduziu severamente as trocas gasosas das plantas de ambos os genótipos, Pitiúba e TVU; contudo, os decréscimos nas taxas de assimilação de CO₂, condutância estomática e de transpiração foram sempre maiores nas plantas do genótipo Pitiúba em comparação àquelas do TVU, independente do tempo analisado (2, 4, 6, 8 e 16 dias de salinidade) (**Figuras 22 e 23**). Além disso, as maiores taxas fotossintéticas das plantas TVU sob salinidade estão em concordância com a maior eficiência de carboxilação da Rubisco (A/C_i) em todos os tempos analisados (**Figura 24**).

Os decréscimos nas taxas de assimilação de CO₂ das plantas de feijão, independente do genótipo, foram decorrentes de fatores estomáticos e não estomáticos. Após 2 dias de exposição ao estresse salino, a baixa condutância estomática (**Figura 23A**) possivelmente restringiu a entrada de CO₂ na câmara subestomática, evidenciada pelas reduções nas concentrações internas de CO₂ (C_i) (**Figura 24A**), o que, conseqüentemente, limitou a fotossíntese líquida das plantas de ambos os genótipos (**Figura 22**). Mesmo assim, as plantas de feijão apresentaram alta eficiência de carboxilação da Rubisco (relação A/C_i permaneceu inalterada pelo estresse salino) (**Figura 24B**), sugerindo que apenas limitações estomáticas foram os fatores preponderantes no início da exposição aos sal.

Após esse período (4 a 16 dias), as limitações na eficiência fotossintética foram ocasionadas por fatores estomáticos e não estomáticos, pois os decréscimos na condutância estomática (**Figura 23A**) foram acompanhados por diminuições nas concentrações internas de CO₂ (**Figura 24A**), e a eficiência de carboxilação da Rubisco foi reduzida pelo estresse (**Figura 24B**). Em todos os casos, os dados evidenciam claramente que plantas de feijão do genótipo TVU apresentaram melhor desempenho quando submetidas à salinidade, o que resultou em maior crescimento/menor tolerância ao estresse (**Figura 21**). De modo similar, Yoshida e colaboradores (2016) demonstraram que a eficiência fotossintética de plantas de *V. unguiculata* foi afetada negativamente pelo estresse salino (NaCl a 100 mM), sendo os efeitos mais proeminentes nos genótipos sensíveis aos sais. Resultados semelhantes também foram observados em genótipos de milho e sorgo dotados de tolerância diferencial à salinidade (NIU *et al.*, 2012).

O melhor desempenho fotossintético das plantas do genótipo TVU foi associado com a alta eficiência fotoquímica do PSII (**Figura 25A**). Evidências disso é que a maior eficiência quântica efetiva do PSII (ϕ PSII) sob estresse (**Figura 25B**) foi acompanhada por uma elevada taxa de transporte de elétrons (ETR) (**Figura 26A**) e manutenção do quenching fotoquímico (qP) (**Figura 27A**); demonstrando que plantas do genótipo TVU apresentam maior eficiência para absorver e transportar os elétrons ao longo da cadeia transportadora de elétrons tilacoidal e sintetizar NADPH e ATP. Dando suporte a essas evidências, plantas do genótipo TVU mostraram maiores níveis de expressão do gene *PGR5-like protein 1A* (TR57929) (**Tabela S1**), que codifica uma proteína fundamental para regulação do gradiente de prótons durante a síntese de ATP (YAMORI *et al.*, 2016).

Adicionalmente, sob salinidade, as altas taxas de assimilação de CO₂ e a elevada eficiência fotoquímica coincidiram com o maior conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Clf *a*, Clf *b*, Clf total e carotenoides) (**Figura 28**), uma resposta acompanhada pelo incremento na expressão do gene *HEMA* (*Glutamyl-tRNA reductase-binding protein*, ID – TR8627), que atua na síntese de clorofilas (**Tabela S1**). Tais resultados sugerem que plantas do genótipo TVU apresentam maior capacidade para manter/sintetizar as moléculas que absorvem energia luminosa, via atividade de enzimas de biossíntese ou mecanismos fotoprotetores, mantendo uma alta eficiência do fotossistema II e da maquinaria fotossintética. Essa hipótese é corroborada pela maior expressão de genes estruturais do fotossistema no primeiro tempo de análise, tais como o *Light-harvesting complex I chlorophyll* (TR354) (**Figura 10**). Esses dados estão de acordo com os achados de Turan e Tripathy (2015) e Yuan e colaboradores (2017). Os autores demonstraram que plantas de arroz e *Cucumis sativus* mostraram um

declínio nos teores de clorofila a, b e total e de carotenoides, com os maiores decréscimos nos genótipos sensíveis ao estresse salino. Além disso, os maiores teores de pigmentos fotossintéticos nas plantas dos genótipos tolerantes foram acompanhados pelo aumento na expressão de genes relacionados ao metabolismo de clorofilas, como *HEMA1* e *UROD* (TURAN; TRIPATHY, 2015; YUAN *et al.*, 2017).

Por outro lado, o baixo desempenho fotossintético das plantas do genótipo Pitiúba sob salinidade foi resultado de danos severos ao aparato fotossintético. A eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm) foi seriamente comprometida logo após seis dias da exposição aos sais, sendo esse efeito intensificado com a imposição do estresse (**Figura 25A**). Associado a isso, houve uma redução progressiva na eficiência quântica efetiva do PSII (ϕ PSII) (**Figura 25B**), que foi acompanhada por decréscimos na taxa de transporte de elétrons (ETR) ao longo do PSII (**Figura 26A**). Adicionalmente, a baixa eficiência fotoquímica foi associada a uma maior dissipação não fotoquímica de elétrons, principalmente nos últimos tempos de análise (**Figura 27B**). Resultados similares foram observados por Wang e colaboradores (2017) e Qu e colaboradores (2013) em plantas de algodão e milho, respectivamente. Em ambos os casos, os autores reportaram que a alta sensibilidade ao estresse salino foi associada a danos aos fotossistemas I e II ocasionados pelo estresse, em especial a relação FV/Fm, qP e NPQ, o que resultou em menor atividade fotoquímica e assimilação de carbono, reduzindo consideravelmente o crescimento das plantas.

Outro fator determinante para a menor eficiência da maquinaria fotossintética foi o baixo acúmulo de pigmentos fotossintéticos (**Figura 28**), sugerindo que plantas Pitiúba apresentaram menor disponibilidade de moléculas para absorver elétrons. Assim, mesmo havendo dissipação não fotoquímica de uma fração dos elétrons (aumento no NPQ) (**Figura 27B**), os elétrons remanescentes não empregados nos processos de assimilação de CO₂ podem ter resultado no acúmulo excessivo de energia ao longo do PSII, sendo direcionados para outros processos celulares (por exemplo, fotorrespiração, metabolismo do nitrogênio ou reação de Mehler) (CHAVES *et al.*, 2009, LAMBREV *et al.*, 2012), como evidenciado pelo maior indicativo de dreno alternativo de elétrons (\uparrow ETR/A) (**Figura 26B**).

Um possível dreno de elétrons foi a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais poderiam ter ocasionado danos as membranas celulares (**Figura 32**), interrompendo a homeostase redox celular. Como consequência, as EROs em excesso intensificaram os danos ao aparato fotossintético, incluindo a degradação dos pigmentos fotossintéticos e de outros componentes estruturais dos fotossistemas (pela oxidação de proteínas, por exemplo) (ALMEIDA *et al.*, 2017). Como resultado da menor eficiência

fotoquímica, as taxas fotossintéticas (assimilação de CO₂) foram seriamente comprometidas pela salinidade o que, conseqüentemente, restringiu o crescimento das plantas (**Figuras 21 e 22**).

6.3 Plantas do genótipo TVU regulam mais eficientemente a homeostase iônica e redox sob estresse salino

O acúmulo excessivo de ROS nos tecidos vegetais pode resultar em diversos danos ao metabolismo celular, afetando a estrutura de lipídios de membrana e atividade de enzimas, bem como oxidando ácidos nucléicos e outras biomoléculas (PARIDA; DAS, 2005). No presente estudo, plantas de feijão submetidas à salinidade mostraram maiores danos de membrana que o controle, independente do genótipo e do tempo de análise (**Figura 32**). Contudo, após 16 dias de salinidade, os teores de MDA foram muito superiores nas folhas do genótipo Pitiúba em comparação com o genótipo TVU. Vale ressaltar que, embora plantas do genótipo Pitiúba tenham acionado mecanismos de defesa antioxidante, incluindo a atividades de enzimas (SOD, APX e GPX) e expressão de genes (*Catalase* e *Glutathione peroxidase*), tais respostas não foram suficientes para mitigar os danos oxidativos às membranas celulares (**Figura 32**) e ao aparato fotossintético (**Figuras 22 e 25A**), o que foi concordante com a maior sensibilidade ao estresse salino (**Figura 21**).

Por outro lado, os menores danos oxidativos registrados nas plantas do genótipo TVU podem ser decorrentes da ação efetiva de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (**Figuras 32 e 33**). Evidências disso é que, no segundo tempo de análise (16 dias), a atividade das enzimas SOD, APX e GPX no genótipo TVU sob estresse foi muito maior que no controle (**Figura 33**), bem como os níveis de expressão dos genes *DEAD-box* e *Glutathione peroxidase* foram superiores àqueles de plantas estressadas do genótipo Pitiúba (**Tabela S1**). Além disso, é provável que antioxidantes não enzimáticos (incluindo o ciclo do ascorbato-glutationa) também tenham atuado na regulação da homeostase redox das plantas TVU, em conjunto com as enzimas antioxidantes, pois a extensão dos danos oxidativos foi muito menor que àquele de plantas Pitiúba (**Figura 32**) e a atividade das enzimas sob estresse foi bastante similar em ambos os genótipos (**Figura 33**).

Pesquisas recentes têm apontado para a capacidade antioxidante como mecanismo fundamental para a tolerância de plantas ao estresse salino, como relatado em milho (ABDELGAWAD *et al.*, 2016), arroz (KAUR *et al.*, 2016) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) (TAIBI *et al.*, 2016). Em todos os casos, o melhor desempenho frente ao estresse salino foi

observado nas plantas que apresentaram aumentos na expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo, em ação conjunta com antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT, APX, GPX) e não-enzimáticos (ciclo ascorbato-glutationa), associado com redução nos níveis de MDA.

Diversos estudos têm demonstrado que espécies glicófitas desenvolveram inúmeros mecanismos para evitar os efeitos de íons tóxicos sob salinidade, envolvendo principalmente a manutenção de baixos níveis de Na^+ e de altos níveis de K^+ , constituindo um impacto considerável na tolerância ao estresse salino (HORIE *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2016; 2017a; WANG *et al.*, 2017). A manutenção de uma elevada relação K^+/Na^+ citosólica é fundamental para a continuidade da atividade dos processos celulares, especialmente das enzimas dependentes de K^+ (MUNNS; TESTER, 2008, ASSAHA *et al.*, 2017).

Dentre os mecanismos ativados para o controle do acúmulo de Na^+ e da homeostase iônica, destacam-se a absorção de Na^+ pela raiz, o controle do efluxo de Na^+ nas células, a compartimentalização desse íon nos vacúolos e o controle sobre o transporte de Na^+ para outras regiões da planta (MUNNS; TESTER, 2008; PRISCO; GOMES-FILHO; MIRANDA, 2016). Todos esses processos envolvem a participação de transportadores, bombas e canais de íons da membrana plasmática e do tonoplasto (PANDEY *et al.*, 2016, MIRANDA *et al.*, 2017a).

Nesse estudo, os dados de acúmulo de íons sugerem que a tolerância ao estresse salino de plantas de feijão pode estar intimamente relacionada com a restrição do acúmulo de Na^+ nos tecidos, envolvendo tanto mecanismos de exclusão nas raízes como de compartimentação no vacúolo e/ou alocação nos diferentes órgãos das plantas (**Figuras 29, 30 e 31**). Essa ideia é suportada pelo acúmulo de Na^+ nas raízes, caules e folhas e pela eficiência da maquinaria fotossintética das plantas de feijão sob condições de estresse.

Os resultados sugerem que a acumulação reduzida de Na^+ no genótipo TVU (**Figura 29**) foi decorrente da maior extrusão desse íon nas raízes pela rota SOS, o que consequentemente restringiu seu transporte e acumulação nos tecidos aéreos (JI *et al.*, 2013, MIRANDA *et al.*, 2017a). Além disso, é provável que o Na^+ presente nas folhas foi compartimentado nos vacúolos via transportadores NHX Na^+/H^+ , pois houve maior ativação do gene *V-ATPase* (TR22228|c0_g2) que codifica para a H^+ -ATPase vacuolar, um bomba de prótons fundamental na formação do gradiente de potencial eletroquímico necessário para a atividade do antiporte NHX (SOBREIRA *et al.*, 2014, PRISCO; GOMES-FILHO; MIRANDA, 2016, ALMEIDA *et al.*, 2017). Em outras palavras, embora o conteúdo de Na^+ nas folhas do TVU tenha sido muito maior do que no controle, é provável que esse íon tenha permanecido no vacúolo das células das folhas e, dessa forma, não causou efeito tóxico sobre

a eficiência fotossintética. Aliado a isso, plantas TVU também alocaram maior quantidade de íons K^+ nas folhas, o que resultou na maior relação K^+/Na^+ sob estresse (**Figuras 30 e 31**). Assim, o controle efetivo da homeostase iônica das plantas estressadas do genótipo TVU foi refletido no melhor desempenho do aparato fotossintético (**Figuras 22, 25, 29, 30 e 31**), sugerindo que os mecanismos de tolerância à salinidade envolvem o ajuste fino de diferentes vias de respostas ao estresse.

Em contraste, plantas do genótipo Pitiúba acumularam elevados teores de Na^+ nos caules e folhas, resultando na alta exposição dos tecidos fotossintetizantes (**Figura 29**) a esse íon tóxico, o que afetou severamente o desempenho da maquinaria fotossintética (**Figuras 22, 25 e 28**) e aumentou a sensibilidade das plantas ao estresse salino (**Figura 21**).

6.4. Rotas de sinalização e fatores de transcrição envolvidos nas respostas de plantas de feijão ao estresse salino

A análise do transcriptoma dos genótipos Pitiúba e TVU revelou que a aclimação de plantas de feijão ao estresse salino é um processo bastante complexo e envolve uma rede intrincada de vias de sinalização e fatores de transcrição. Os dados de RNA-seq demonstraram que houve uma reprogramação na expressão de genes envolvidos na sinalização mediada por hormônios, pois genes que codificam enzimas de biossíntese de auxinas (IAA), ácido jasmônico (JA), giberelinas (GA), etileno (ETHY) e ácido abscísico (ABA) apresentaram modulação diferencial em função do tratamento salino ou do genótipo de feijão (**Tabelas S1 e S2**).

Os fitohormônios são importantes reguladores do crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo um balanço coordenado da síntese/degradação de hormônios crucial para a continuidade dos processos fisiológicos e bioquímicos (KHAN *et al.*, 2012 ; IQBAL *et al.*, 2014). Quando as plantas são expostas a estresses ambientais, a sinalização por hormônios é ativada e ocorre um desencadeamento de mecanismos específicos de proteção da planta. Embora a resposta de plantas à salinidade dependa de diversos fatores, os fitohormônios são reconhecidamente as substâncias endógenas mais importantes responsáveis pelas respostas fisiológicas da planta, que eventualmente levam à adaptação à salinidade (FAHAD *et al.*, 2014, WANI *et al.*, 2016). Recentemente, Yang *et al.* (2017) e Shu *et al.* (2017) reportaram o papel fundamental dos hormônios ácido abscísico e giberelina na modulação das respostas de plantas de sorgo e soja sob estresse salino.

Independente da espécie de planta, as respostas a determinado estresse resultam de uma série de reações que iniciam com a percepção do estresse, seguidas pela transdução do sinal para o local das mudanças metabólicas e, por fim, a ativação de genes/proteínas específicas (PRISCO; GOMES-FILHO, MIRANDA, 2016). Tais respostas sempre envolvem rotas complexas de sinalização, com a participação de fitohormônios, mensageiros secundários (Ca^{2+} , H_2O_2 , dentre outros) e fatores de transcrição, sendo esses últimos responsáveis por ativar a expressão de genes específicos. Nesse sentido, os fatores de transcrição são ferramentas genéticas importantes para analisar culturas tolerantes ao estresse salino, porque desempenham papéis fundamentais na modulação de diferentes genes que respondem ao estresse. No presente estudo, diversos fatores de transcrição foram ativados nos tecidos das plantas de feijão sob estresse, dentre eles os fatores AP2/ERF, bZIP, NAC, MYB e WRKY (**Tabelas S1 e S2**).

Plantas estressadas do genótipo TVU mostraram incrementos na expressão dos genes *WRKY* (TR35646), *MYB* (TR1162), *bZIP* (TR92660), *CIPK3* (TR46607) e *CIPK14* (TR4434), que são fatores de transcrição fundamentais nas respostas de plantas ao estresse salino (**Tabelas S1 e S2**). Os genes *WRKY*, *MYB* e *bZIP* codificam para um grupo de fatores de transcrição envolvidos nas respostas dependente de ABA (WANG *et al.*, 2016, KUMAR *et al.*, 2017).

O fator de transcrição WRKY atua na resposta da planta ao estresse através da regulação direta de genes funcionais, bem como pela interação com outros fatores de transcrição (JIANG *et al.*, 2017). Estudos anteriores têm relatado a importância desse fator de transcrição frente ao estresse salino. Em *Arabidopsis*, a super expressão do gene *GhWRKY34* aumentou a tolerância das plantas à salinidade, uma resposta associada com o controle restrito da produção de EROS e da homeostase de Na^+/K^+ (ZHOU *et al.*, 2015). De modo similar, Agarwal e colaboradores (2016) demonstraram que a expressão diferencial do gene *JcWRKY* aumentou a tolerância de plantas de tabaco ao estresse salino via homeostase de EROS induzida por ácido salicílico em plantas transgênicas. Nesse estudo, a maior expressão do gene *WRKY* no genótipo tolerante (após 1 dia de estresse) foi acompanhada pela redução nos danos oxidativos (menor valor de MDA) (**Figura 32**) e pelo aumento na atividade de enzimas antioxidantes (SOD, POD e CAT) (**Figura 33**), que culminou na alta eficiência do aparato fotossintético (**Figuras 22 e 25**).

O MYB participa de inúmeros processos nas células vegetais, sendo determinante para o desenvolvimento de órgãos e para a tolerância de plantas à estresses abióticos, dentre eles a salinidade (WANG *et al.*, 2016). Em feijão, a maior expressão do fator de transcrição

MYB sob estresse salino foi observado apenas nas plantas do genótipo tolerante (TVU), sugerindo que esse fator de transcrição é essencial para a aclimação das plantas a condições ambientais estressantes (**Tabela S1**).

O bZIP (basic leucine zipper) é outro importante fator de transcrição para vários processos biológicos das plantas, pois está envolvido diretamente nos eventos de germinação e desenvolvimento de sementes e flores, bem como na sinalização por fitohormônios e na defesa de plantas contra estresses bióticos e abióticos (seca, altas temperaturas, salinidade) (SORNARAJ *et al.*, 2016). De modo interessante, no presente estudo, plantas do genótipo TVU apresentaram incrementos massivos (aumento de 15 vezes em comparação ao controle) na expressão de genes que codificam para o fator de transcrição ABF, um membro da família bZIP (**Tabela S1**). Similarmente, Liang *et al.* (2016) demonstraram que o gene *GhABF2* conferiu tolerância aos estresses salino e hídrico em plantas de algodão, uma resposta associada com aumentos nos níveis de prolina e ativação das enzimas antioxidantes (SOD e CAT).

Membros da família CIPK compreendem fatores de transcrição extremamente importantes para as respostas de plantas ao estresse salino (MIRANDA *et al.*, 2017b). Proteínas CBL e CBL-interacting protein kinase (CIPK) foram originalmente identificadas em plantas modelos de *A. thaliana* e participam de respostas cruzadas entre diversos estresses abióticos (estresse osmótico, indução por ABA e seca) (MANIK *et al.*, 2015, MAO *et al.*, 2016). Em arroz, a super expressão do gene *CIPK1* resultou na maior tolerância das plantas ao estresse salino (ABDULA *et al.*, 2016). No presente estudo, é provável que as proteínas CIPK também tenham participado das vias de sinalização e respostas ao estresse nas plantas do genótipo tolerante (TVU), pois os genes *CIPK3* e *CIPK14* foram regulados positivamente nos tecidos foliares sob salinidade (**Tabela S1**).

Plantas do genótipo Pitiúba também intensificaram a expressão de fatores de transcrição sob condições de salinidade, mas, ao contrário das plantas TVU, ativaram principalmente os genes *NAC* (TR6212), *bHLH3* (TR32679) e *AP2/ERF* (TR64674). As proteínas NAC e BHLH são largamente distribuídas em plantas, desempenhando papéis vitais na regulação do crescimento, desenvolvimento e nas respostas a estresses abióticos, como seca, salinidade e frio (ABID *et al.*, 2017). Plantas de arroz com expressão aumentada do gene *OsNAC2* mostraram intensificação nos produtos da via sinalização dependente de ABA, o que resultou no melhor desempenho das plantas sob estresse salino (SHEN *et al.*, 2017). Os autores reportaram que a maior tolerância das plantas foi atribuída principalmente a ativação de genes responsivos ao estresse e ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes (SOD,

POD e CAT). Em trigo, a super expressão do gene *TabHLH1* regulou eficientemente diversos processos fisiológicos e bioquímicos e aumentou a tolerância das plantas aos estresses hídrico e salino (YANG *et al.*, 2016). Sob estresse, plantas transgênicas apresentaram controle efetivo da condutância estomática, aumento nos níveis de prolina e açúcares, e reduções nos teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂); indicando que o fator de transcrição bHLH tem papel essencial no ajustamento osmótico e na homeostase redox de plantas sob estresse.

Os resultados obtidos nas plantas Pitiúba sugerem que os fatores de transcrição *NAC* e *BHLH* podem não ser eficientes para ativar as vias de defesa das plantas de *V. unguiculata* sob salinidade, pois, mesmo havendo intensificação na expressão dos genes, foram registrados maiores danos oxidativos e as plantas apresentaram maior sensibilidade ao estresse salino em comparação àquelas do genótipo TVU (**Figuras 32 e 33**). Um estudo recente do transcriptoma de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), Hiz *et al.* (2014) identificaram vários fatores de transcrição induzidos em resposta ao estresse salino, que foram considerados cruciais para a maior tolerância dos genótipos às condições estressantes. Alguns deles também foram regulados positivamente nos tecidos das plantas de *V. unguiculata* do genótipo tolerante, como *AP2/ERF*, *bHLH*, *bZIP*, *MYB*, *NAC*, e *WRKY*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados permitem concluir que plantas de *Vigna unguiculata* do genótipo TVU apresentam respostas mais efetivas e melhor tolerância ao estresse salino com NaCl a 100 mM. As plantas do genótipo Pitiúba mostraram alta sensibilidade ao estresse com a exposição ao longo do tempo.

A maior aclimação do genótipo TVU é decorrente da ativação eficiente de vias metabólicas que culminam no melhor desempenho da maquinaria fotossintética, de mecanismos antioxidantes e do estabelecimento de uma homeostase iônica adequada. Essas vias envolvem mecanismos complexos de defesa, com a participação de moléculas de sinalização, fatores de transcrição e efetores de respostas, incluindo transporte de íons, enzimas, componentes estruturais e outros componentes.

Esses resultados fornecem dados valiosos para os estudos voltados para o aumento da tolerância de plantas à salinidade, tanto pela identificação de vias metabólicas responsivas ao estresse como pela elucidação de potenciais candidatos para estudos de engenharia genética. Especificamente, deve-se destacar os fatores de transcrição WRKY, bZIP, MYB e AP2/ERF como importantes componentes das rotas de defesa de plantas. Entretanto, mais estudos devem ser realizados, como por exemplo, devem ser destinados esforços ao entendimento mais aprofundado da inter-relação da rede intrínseca de respostas ao estresse salino.

REFERÊNCIAS

- ABDELGAWAD, Hamada; ZINTA, Gaurav; HEGAB, Momtaz M.; PANDEY, Renu; ASARD, Han; ABUELSOUD, Walid. High Salinity Induces Different Oxidative Stress and Antioxidant Responses in Maize Seedlings Organs. **Frontiers in Plant Science**, 7(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00276>, 2016.
- ABDULA, Sailila E; LEE, Hye-Jung; RYU, Hojin; KANG, Kwon Kyoo; NOU, Illsup; SORRELLS, Mark E; CHO, Yong-Gu. Overexpression of BrCIPK1 Gene Enhances Abiotic Stress Tolerance by Increasing Proline Biosynthesis in Rice. **Plant Molecular Biology Reporter** v. 34, n. 2, p. 501–511, 2016.
- ABID, Muhammad Ali; LIANG, Chengzhen; MALIK, Waqas; MENG, Zhigang; TAO, ZHU; MENG, Zhaohong; ASHRAF, Javaria; GUO, Sandui; ZHANG, Rui. Cascades of Ionic and Molecular Networks Involved in Expression of Genes Underpin Salinity Tolerance in Cotton. **Journal of Plant Growth Regulation**. Agosto, 2017.
- ABREU, Carlos Eduardo Braga de; ARAÚJO, Gyedre dos Santos; MOREIRA, Ana Cristina de Oliveira Monteiro, COSTA, José Hélio; LEITE, Hugo de Brito; MORENO, Frederico Bruno Mendes Batista; PRISCO, José Tarquínio; GOMES-FILHO, Enéas. Proteomic analysis of salt stress and recovery in leaves of *Vigna unguiculata* cultivars differing in salt tolerance. **Plant Cell Reports**. v.33, p.1289–1306. Abril, 2014.
- ACOSTA-MOTOS, Jose Ramón; ORTUÑO, Maria Fernanda; BERNAL-VICENTE, Agustina; DIAZ-VIVANCOS, Pedro; SANCHEZ-BLANCO, Maria Jesus; HERNANDEZ, Jose Antonio. Plant Responses to Salt Stress: Adaptive Mechanisms. **Agronomy**, 7(1), 18, 2017.
- AGARWAL, Pradeep K.; JHA, Bhavanath. Transcription factors in plant and ABA dependent and independent abiotic stress signaling. **Biologia Plantarum**, 54 (2), 201–212. 2010.
- AGARWAL, Parinita; DABI, Mitali; SAPARA, Komal K.; JOSHI, Priyanka S; AGARWAL, Pradeep K. Ectopic Expression of JcWRKY Transcription Factor Confers Salinity Tolerance via Salicylic Acid Signaling. **Frontiers in Plant Science**, 7(October), 1–16. 2016.
- AHANGER, Mohammad Abass; AKRAM, Nudrat Aisha; ASHRAF, Muhammad; ALYEMENI, Mohammed Nasser; WIJAYA, Leonard; AHMAD, Parvaiz. Plant responses to environmental stresses — from gene to biotechnology, **AOB Plants**.2017.
- AHMAD, Parvaiz; LATEF, Arafat A. Abdel; HASHEM, Abeer; ABD_ALLAH, Elsayed F; GUCEL, Salih; TRAN, Lam-Son P. Nitric Oxide Mitigates Salt Stress by Regulating Levels of Osmolytes and Antioxidant Enzymes in Chickpea. **Frontiers in Plant Science** v. 7, n. March, p. 1–11, 2016.
- ALMEIDA, Diego M.; OLIVEIRA, Margarida; SAIBO, Nelson J. M. Regulation of Na⁺ and K⁺ homeostasis in plants: Towards improved salt stress tolerance in crop plants. **Genetics and Molecular Biology**, 40(1), 326–345, 2017.

ALMEIDA, Pedro; BOER, Gert-jan De; BOER, Albertus H. De. Differences in shoot Na⁺ accumulation between two tomato species are due to differences in ion affinity of HKT1 ; 2. **Journal of Plant Physiology** v. 171, n. 6, p. 438–447, 2014.

ALTSCHUL, Stephen Frank; MADDEN, Thomas L; SCHÄFFER, Alejandro A.; I ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, David.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. **Nucleic Acids Research**, 25, 3389-3402. 1997.

ANDREWS, Sthephen. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. 2010.

ANSORGE, Wilhelm J. Next Generation DNA Sequencing (II): Techniques, Applications. **Journal of Next Generation**. March, 2016.

ANSORGE, Wilhelm J. Next-generation DNA sequencing techniques. **New Biotechnology** v. 25, n. 4, p. 195–203 .,1871-6784 (Print). 2009.

ASSAHA, Dekoum V M *et al.* Biochemical and Biophysical Research Communications Salinity-induced expression of HKT may be crucial for Na⁺ exclusion in the leaf blade of huckleberry (*Solanum scabrum* Mill.), but not of eggplant (*Solanum melongena* L.). **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 460, n. 2, p. 416–421, 2015.

ASSAHA, Dekoum V.M.; MEKAWY, Ahmad Mohammad M.; UEDA, Akihiro; Hirofumi SANEOKA. The role of Na⁺ and K⁺ transporters in salt stress adaptation in glycophytes. **Frontiers in Physiology** v. 8, n. jul , 2017.

ATTIA, Tarek Hamed; SAEED, Maysaa Abdallah. Next Generation Sequencing Technologies: A Short Review. **Next Generation Sequencing & Application** S1:006. doi:10.4172/2469-9853.S1-006. 2016.

BAHMANI, Kaivan; NOORI, Seyed Ahmad Sadat; DARBANDI, Ali Izadi; AKBARI, Azam. Molecular mechanisms of plant salinity tolerance: a review. **Australina journal of crop science**. v. 9, n. 4, p. 321–336, 2015.

BASU, Supratim; RABARA, Roel. Abscisic acid — An enigma in the abiotic stress tolerance of crop plants. **Plant Gene** n. April, p. 0–1, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352407317300173>>.

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

BUNNIK, Evelien M.; LE ROCH, Karine G. An Introduction to Functional Genomics and Systems Biology. **Advances in Wound Care** v. 2, n. 9, p. 490–498 , 2013. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/wound.2012.0379>>.

CAKMAK, I., HORST, J. H. Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*).1991).

- CAO, Lei *et al.* The Glycine soja NAC transcription factor GsNAC019 mediates the regulation of plant alkaline tolerance and ABA sensitivity. **Plant Molecular Biology** v. 0, n. 0, p. 0, 2017.
- CARRILLO, Y., BALL, B.A., BRADFORD, M.A., JORDAN, C.F., MOLINA, M. Soil fauna alter the effects of litter composition on nitrogen cycling in a mineral soil. **Soil Biol. Biochem.** 43, 1440–1449. 2011.
- CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-80, 1975
- CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany** v. 103, n. 4, p. 551–560, 2009.0305-7364. 2009.
- CHEN, R., CHENG, Y., HAN, S., VAN HANDEL, B., DONG, L., LI, X., XIE, X. Whole genome sequencing and comparative transcriptome analysis of a novel seawater adapted, salt-resistant rice cultivar – sea rice 86. **BMC Genomics** v. 18, n. 1, p. 655, 2017.
- CHOUDHURY, Feroza K. *et al.* Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal** v. 90, n. 5, p. 856–867, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/tpj.13299>>.
- COÊLHO, Jackson Dantas; XIMENES, Luciano J. F. Produção de grãos no Nordeste : de olho na China. **Caderno Setorial ETENE**, ano 1, n. 2, outubro, 2016.
- CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO 12°. **Levantamento da safra brasileira de grãos 2015/2016**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_09_15_18_32_boletim_12_setembro.pdf.
- CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira. **Monitoramento agrícola- Safra 2017** v. 4, n. 1, p. 1–98 , 2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>.2318-6852.
- CONESA A, GÖTZ S, GÁRCIA-GÓMEZ JMG, TEROL J, TALÓN M, ROBLES M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics** v. 21, p.3674-3676, 2005.
- CONESA, A. AND GÖTZ,S. (2008) Blast2go: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. **International. Journal of Plant Genomics**, 2008, 1–13
- CONESA, Ana *et al.* A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome Biology** v. 17, n. 1, p. 13 , 2016.
- 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.

CRAMER, Grant R *et al.* Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology** v. 11, n. 1, p. 163, 2011. Disponível em: <<http://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-11-163>>.1471222985.

DANTAS, J. P.; MARINHO, F. J. L.; Ferreira, M. M. M.; Amorim, M. S. N.; Andrade, S. I. O.; Salles, A. L. Avaliação de genótipos de caupi sob salinidade. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.6, p.425-430, 2002.

DEINLEIN, Ulrich *et al.* Plant salt-tolerance mechanisms. **Trends in Plant Science** v. 19, n. 6, p. 371–379 , 2014.1878-4372 (Electronic)n1360-1385 (Linking).

DENG, Youping *et al.* Functional Genomics, Genetics, and Bioinformatics 2016. **BioMed Research International** v. 2016, p. 10–13 , 2016.

DUAN, Lina; DIETRICH, Daniela; HAN NG, Chong; CHAN, Penny Mei Yeen ; BHALERAO, Rishikesh; BENNETT, Malcolm J.; DINNENYA, José R.. Endodermal ABA Signaling Promotes Lateral Root Quiescence during Salt Stress in *Arabidopsis* Seedlings. **The Plant Cell** v. 25, n. 1, p. 324–341 , 2013. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.112.107227>>.1532-298X .

FAGERIA, N. K.; SOARES FILHO, W. DOS S.; GHEYI, H. R. Melhoramento genético vegetal e seleção de cultivares tolerantes à salinidade. In: Gheyi, H. R.; Dias, N. da S.; Lacerda, C. F. de (ed.); Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicativos. Fortaleza: INCT Sal, 2010, cap. 13, p.205-218.

FAHAD, S. *et al.* Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. **Plant Growth Regulation** v. 75, n. 2, p. 391–404 , 2015.0167-6903.

FAO, Global soil status, processes and trends, In: **Status of the world`s soil resources (SWRS)** - Main report, Rome, Italy, 2015

FAO. (2016). Key to achieving the 2030 Agenda for Sustainable Development. Food And Agriculture Organization, 32. <https://doi.org/15499E/2/04.16>

FAROOQ, Muhammad *et al.* Effects, tolerance mechanisms and management of salt stress in grain legumes. **Plant Physiology and Biochemistry** v. 118, p. 199–217 , 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.020>>.

FREIRE FILHO, F. R., RIBEIRO, V. Q., ROCHA, M. D. R., SILVA, K. J. D. E., NOGUEIRA, M. D. S. D. R., & RODRIGUES, E. V. (2011). *Feijão-caupi no Brasil: Produção, melhoramento genético, avanços e desafios*. Embrapa Meio-Norte.

FLOWERS, Timothy J.; COLMER, Timothy D. Plant salt tolerance: Adaptations in halophytes. **Annals of Botany** v. 115, n. 3, p. 327–331,.0305-7364 1095-8290. 2015

FLOWERS, Timothy J.; MUNNS, Rana; COLMER, Timothy D. Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. **Annals of Botany** v. 115, n. 3, p. 419–431, 2015.0305-7364.

FUJITA, Yasunari; FUJITA, Miki; SHINOZAKI, Kazuo; Yamaguchi-Shinozaki, Kazuko. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research** v. 124, n. 4, p. 509–525 , 2011.0918-9440.

FURTADO, G. F.; SOUSA JÚNIOR, J. R.; XAVIER, D. A.; ANDRADE, E. M. G.; SOUSA, J. R. M. Pigmentos fotossintéticos e produção de feijão *Vigna unguiculata* L. Walp. sob salinidade e adubação nitrogenada. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.9, p.291-299, 2014

GADELHA, C.G., MIRANDA. DE S. ALENCAR, N.L.M., COSTA, J.H., PRISCO, J. T., GOMES-FILHO,E. 2017. Exogenous nitric oxide improves salt tolerance during establishment of *Jatropha curcas* seedlings by ameliorating oxidative damage and toxic ion accumulation. **Journal of Plant Physiology** v. 212, p. 69–79

GAPPER NE, GIOVANNONI JJ, WALTAKINS CB. Understanding development and ripening of fruit crops in an ‘omics’ era. **Horticulture Research** v. 34, 2014.

GECHEV, T. S.; HILLE, J. Molecular basis of plant stress. **Cellular and Molecular Life Sciences** v. 69, n. 19, p. 3161–3163 , 2012.1420-9071 (Electronic)n1420-682X (Linking).

GHOSH, Bhaswati; ALI MD, Nasim; GANTAIT, Saikat. Response of Rice under Salinity Stress: A Review Update. **Journal of Rice Research**. v. 4, n. 2, p. 2–9 , 2016.

GIANNOPOLITIS C. N.; RIES S. K.; Superoxide dismutases. I Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*. v. 59, p. 309-314, 1977.

GLENN, Travis C. Field guide to next-generation DNA sequencers. **Molecular Ecology Resources** v. 11, n. 5, p. 759–769 , 2011.1755-098X.

GOGILE, A., ANDARGIE, M., ; MANIKANIDAN, M. The Response of Some Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Genotypes for Salt Stress during Germination and Seedling Stage. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry** v. 9, n. 4, p. 73–84 , 2013.

GONDIM, F. A. et al. Efeitos do H₂O₂ no crescimento e acúmulo de solutos em plantas de milho sob estresse salino. *Revista Ciência Agronômica*, v. 42, n. 02, p. 373-381, 2011.

GORJI, Taha; TANIK, Aysegul; SERTEL, Elif. Soil Salinity Prediction, Monitoring and Mapping Using Modern Technologies. **Procedia Earth and Planetary Science** v. 15, p. 507–512 , 2015. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878522015003252>>.18785220.

GOTZ, S. “B2G-FAR, a species centered GO annotation repository”, *Bioinformatics*, Vol. 27 (7), 2011, pp. 919-924

GRABHERR GM, HAAS BJ, YASSOUR M, LEVIN JZ, THOMPSON DA, AMIT I, ADICONIS X, FAN L. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology** v.29 p. 644-652

GUPTA, B., HUANG, B., GUPTA, B., & HUANG, B. (2014). Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics*, 2014, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>

HAKEEM, K. R., AKHTAR, J., SABIR, M.. **Soil science: Agricultural and environmental prospectives**. [S.l: s.n.], (2016). 1-430 p. © Springer International Publishing Switzerland. doi 10.1007/978-3-319-34451-5_2

HAMAMOTO, Shin *et al.* ScienceDirect HKT transporters mediate salt stress resistance in plants : from structure and function to the field. **Current Opinion in Biotechnology** v. 32, n. Figure 1, p. 113–120 , 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.025>>.

HANIN, M., EBEL, C., NGOM, M., LAPLAZE, L., MASMOUDI, K. New Insights on Plant Salt Tolerance Mechanisms and Their Potential Use for Breeding. **Frontiers in Plant Science** v. 7, n. November, p. 1–17 , 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.01787/full>

HANIN, Moez *et al.* New Insights on Plant Salt Tolerance Mechanisms and Their Potential Use for Breeding. **Frontiers in Plant Science** v. 7, n. November, p. 1–17 , 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.01787/full>>.

HASEGAWA, Paul M. Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. **Environmental and Experimental Botany** v. 92, p. 19–31 , 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.03.001>>.00988472.

HAUSER, FELIX; HORIE, TOMOAKI (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters : a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺ / Na⁺ ratio in leaves during. p. 552–565.

HAVIR, E.; McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalases in tobacco leaves. *Plant Physiology*, v. 84, p. 450-455, 1987.

HIZ, M. C., CANHER, B., NIRON, H., TURET, M. (2014). Transcriptome Analysis of Salt Tolerant Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under Saline Conditions. v. 9, n. 3 ,

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Berkely: **University of California Agricultural Experiment Station**, circular n.347, 1950.

HONG, Yongbo *et al.* Overexpression of a Stress-Responsive NAC Transcription Factor Gene ONAC022 Improves Drought and Salt Tolerance in Rice. **Frontiers in Plant Science** v. 7, n. January, p. 1–19 , 2016.

HORIE, Tomoaki; KARAHARA, Ichirou; KATSUHARA, Maki. Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants. **Rice** v. 5, n. 1, p. 11 , 2012. Disponível em: <???.10.1186/1939-8433-5-11.>

HOSSAIN, M. Sazzad; DIETZ, Karl-Josef. Tuning of Redox Regulatory Mechanisms, Reactive Oxygen Species and Redox Homeostasis under Salinity Stress. **Frontiers in Plant Science** v. 7, n. May , 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00548/abstract>>.1664-462X.

HOSSAIN, Mohammad R. *et al.* Trait Specific Expression Profiling of Salt Stress Responsive Genes in Diverse Rice Genotypes as Determined by Modified Significance Analysis of

Microarrays. **Frontiers in Plant Science** v. 7, n. May, p. 1–17 , 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00567/abstract>>.

HUANG G, MA S, BAI L, ZHANG L, MA H, JIA P, LIU J, ZHONG M, GUO Z. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports* 39:969- 987, 2012.

HUANG, Yanhua *et al.* Enhanced Growth Performance and Salinity Tolerance in Transgenic Switchgrass via Overexpressing Vacuolar Na + (K +)/ H + Antiporter. v. 8, n. April, p. 1–13, 2017.

IQBAL N., UMAR S., KHAN N. A., KHAN M. I. R. (2014). A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. *Environ. Exp. Bot.* 100 34–42. 10.1016/j.envexpbot.2013.12.006

JI, H., PARDOB, J.M., BATELLIC , G., OOSTEND , M. J.V., BRESSANE, R.A., LIA,X. The Salt Overly Sensitive (SOS) Pathway : Established and Emerging Roles. v. 6, n. 2, p. 275–286, 2013.

JIANG, Jingjing *et al.* WRKY transcription factors in plant responses to stresses. **Journal of Integrative Plant Biology** v. 59, n. 2, p. 86–101 , 2017.2200822340.

KANDIL, A.A., SHAREIF, A. E., GAD, M.A. 2017. Effect of Salinity on Germination and Seeding Parameters of Forage Cowpea Seed. **Research Journal of Seed Science**, 10: 17-26.

KANEHISA, Minoru; FURUMICHI, Miho; TANABE, Mao; SATO, Yoko; MORISHIMA, Kanae. KEGG : new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. **Nucleic Acids Research** v. 45, n. October, p. 353–361, 2017.

KAR, M., MISHRA, D. (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*.57: 315-319.

KAUR, N., MANISH, D., 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** v. 16, n. 1, p. 131 , 2016. Disponível em: <<http://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-016-0824-2>>.

KHAN N. A., NAZAR R., IQBAL N., ANJUM N. A. (2012). *Phytohormones and Abiotic StressTolerance in Plants*. Berlin: Springer; 10.1007/978-3-642-25829-9

KUMAR, D., HASSAN, M. AL, NARANJO, M. A., AGRAWAL, V., BOSCAIU, M., & VICENTE, O. (2017). Effects of salinity and drought on growth, ionic relations, compatible solutes and activation of antioxidant systems in oleander (*Nerium oleander* L.), 1–22.

KUMAR, Jitendra *et al.* Transcriptional regulation of salinity stress in plants: A short review. **Plant Gene** n. December, p. 0–1, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352407317300112>>.

KUNDU, Suprabuddha; GANTAIT, Saikat. Abscisic acid signal crosstalk during abiotic stress response. **Plant Gene** v. 11, n. May, p. 61–69 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plgene.2017.04.007>>.

LAMBREV, Petar H. *et al.* On the relationship between non-photochemical quenching and photoprotection of Photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics** v. 1817, n. 5, p. 760–769, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.002>>.0005-2728.

LANDER, E.S.; LINTON, L.M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M.C.;BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZHUGH, W. ET AL - Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921, 2001.

LANGMEAD, B., SALZBERG, S. Fast gapped-read alignment with Bowtie. (2013) *Nat Methods*. ; 9(4): 357–359. doi:10.1038/nmeth.1923.

LEVY, Shawn E.; MYERS, Richard M. Advancements in Next-Generation Sequencing. **Annual Review of Genomics and Human Genetics** v. 17, n. 1, p. 95–115. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genom-083115-022413>>.1545-293X (Electronic) 1527-8204 (Linking). 2016

LI, B.; DEWEY, C.N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*.
PMID: 21816040 **DOI:** 10.1186/1471-2105-12-323, 2011.

LI, P. CAO,W., FANG,H., XU,S. YIN,S., ZHANG,Y., LIN,D., WANG,J., CHEN, Y., XU, C., YANG, Z. Transcriptomic Profiling of the Maize (*Zea mays* L.) Leaf Response to Abiotic Stresses at the Seedling Stage. **Frontiers in plant science** v. 8, n. March, p. 290, 2017.

LIANG C., MENG Z., MENG Z., MALIK W., YAN R., LWIN K. M., *et al.* (2016). GhABF2, a bZIP transcription factor, confers drought and salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Sci. Rep.* 6:35040 10.1038/srep35040.

LIANG, Q. WU, Y., WANG, K., BAI, Z., LIU, Q., PAN,Y., ZANG, L., JIANG, B. Chrysanthemum WRKY gene DgWRKY5 enhances tolerance to salt stress in transgenic chrysanthemum. **Scientific Reports** v. 7, n. 1, p. 4799, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-05170-x>>.

LIU, Guanze *et al.* Overexpression of rice NAC gene SNAC1 improves drought and salt tolerance by enhancing root development and reducing transpiration rate in transgenic cotton. **PLoS ONE** v. 9, n. 1, 2014.1932-6203 (Electronic)r1932-6203 (Linking).

LIU, HAORAN SMITA SAHOO1 & BEDABRATA SAHA1 & SANJIB KUMAR PANDA. Physiological responses of three soybean species (*Glycine soja*, *G. gracilis*, and *G. max* cv. Melrose) to salinity stress. **Journal of Plant Research** v. 130, n. 4, p. 723–733, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10265-017-0929-1>>.1026501709.

LIU, Lin *et al.* Comparison of next-generation sequencing systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology** v. 2012, 2012.1110-7251 (Electronic)r1110-7243 (Linking).

MAIA, J. M.; SILVA, S. L. F.; VOIGT, E. L.; MACÊDO, C .E. C. de; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão-caupi sob diferentes níveis de salinidade. *Acta Botanica Brasilica*, Bahia, n.26, v.2, p.342-349, 2012.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e aplicações. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201p.

MANIK, S. M. Nuruzzaman; SHI, Sujuan; MAO, Jingjing; DONG, Lianhong; SU, Yulong; WANG, Qian; LIU, Haobao. The Calcium Sensor CBL-CIPK Is Involved in Plant 's Response to Abiotic Stresses. v. 2015, p. 10–12, 2015.

MAO, Jingjing; MANIK, S. M. Nuruzzaman; SHI, Sujuan; CHAO, Jiangtao; JIN, Yirong; WANG, Qian; LIU, Haobao. Mechanisms and Physiological Roles of the CBL-CIPK Networking System in *Arabidopsis thaliana*. p. 1–15, **GENES**. 2016.

MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics** v. 9, p. 387-402, 2008.

MARDIS, Elaine R. Next-Generation Sequencing Platforms. **Annual Review of Analytical Chemistry** v. 6, n. 1, p. 287–303 , 2013.

MARTIN, J. A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews Genetics** v. 12, n. 10, p. 671–682 , 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg3068>>.1471-0064 (Electronic)r1471-0056 (Linking).

MINER, Grace L.; BAUERLE, William L.; BALDOCCHI, Dennis D. Estimating the sensitivity of stomatal conductance to photosynthesis: a review. **Plant Cell and Environment** v. 40, n. 7, p. 1214–1238 , 2017.1866-6280.

MIRANDA, Rafael de Souza; GOMES-FILHO, Enéas; PRISCO, José Tarquínio; ALVAREZ-PIZARRO, Juan Carlos. Ammonium improves tolerance to salinity stress in *Sorghum bicolor* plants. *Plant Growth Regulation*, v.78, p.121-131, 2016.

MIRANDA, R. DE S., MESQUITA, R. O., COSTA, J. H., ALVAREZ-PIZARRO, J. C., PRISCO, J.T., GOMES-FILHO, E.. Integrative Control Between Proton Pumps and SOS1 Antiporters in Roots is Crucial for Maintaining Low Na⁺ Accumulation and Salt Tolerance in Ammonium-Supplied *Sorghum bicolor*, *Plant and Cell Physiology*, Volume 58, Issue 3, 1 March, Pages 522–536, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw231>. (2017a)

MIRANDA, Rafael De Souza; ALVAREZ-PIZARRO, J. C. ; COSTA, José Hélio; PAULA, Stelamaris de Oliveira, , PRISCO, José Tarquínio; GOMES-FILHO, Enéas. Putative role of glutamine in the activation of CBL/CIPK signalling pathways during salt stress in sorghum. **Plant Signaling & Behavior** Vol. 12 , Iss. 8. (2017b).

MISHRA, Avinash; TANNA, Bhakti. Halophytes: Potential Resources for Salt Stress Tolerance Genes and Promoters. **Frontiers in Plant Science** v. 8, n. May, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00829/full>>.

MISHRA, S., SINGH, B., PANDA, K., PRATAP, B., SINGH, N., MISRA, P., RAI, V., KUMAR, N. SINGH. Association of SNP Haplotypes of HKT Family Genes with Salt Tolerance in Indian Wild Rice Germplasm. **Rice** , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12284-016-0083-8>>.

- MISHRA, Sagarika; BEHURA, Ratikanta; • AWASTHI, Jay Prakash; DEY, Mohitosh; SAHOO, Debeeprasad; BHOWMIK, Sudipta Shekhar Das; PANDA, Sanjib Kumar; SAHOO, • Lingaraj. Ectopic overexpression of a mungbean vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene (VrNHX1) leads to increased salinity stress tolerance in transgenic *Vigna unguiculata* L. Walp. **Molecular Breeding** v. 34, n. 3, p. 1345–1359, 2014.1380-3743.
- MORIYA, Yuki; ITOH, Masumi; OKUDA Shujiro; YOSHIZAWA Akiyasu C.; KANEHISA Minoru. KAAS : an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. v. 35, p. 182–185, 2007.
- MOROZOVA O, MARRA MA. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics** v. 92, p. 255-264, 2008.
- MUCHATE, N. S., NIKALJE, G. C., RAJURKAR, N. S., SUPRASANNA, P., & NIKAM, T. D. (2016). Plant Salt Stress: Adaptive Responses, Tolerance Mechanism and Bioengineering for Salt Tolerance. *Botanical Review*, 82(4), 371–406. <https://doi.org/10.1007/s12229-016-9173-y>
- MUNNS, Rana; GILLIHAM, Matthew. Salinity tolerance of crops - what is the cost? **New Phytologist** v. 208, n. 3, p. 668–673,1469-8137. 2015.
- MUÑOZ-AMATRIÁIN, M., MIREBRAHIM, H., XU, P., WANAMAKER, S. I., LUO, M., ALHAKAMI, H. (2017). Genome resources for climate-resilient cowpea, an essential crop for food security. *Plant Journal*. 89, 1042–1054. doi: 10.1111/tpj.13404
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 1068-1072, 1981.
- NANDHINI, B; CHITDESHWARI, T; RAVIKESAVAN, R. Antioxidative enzyme activities in maize genotypes grown under saline water irrigation. v. 8, n. June, p. 636–642, 2017.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION(NCBI). *Vigna unguiculata* (cowpea) genome. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=vigna+unguiculata>. Acesso em: 28 de setembro de 2017.
- NEGRÃO S, SCHMÖCKEL SM, TESTER M.(2017). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany*. 119(1):1–11. doi:10.1093/aob/mcw191, available online at www.aob.oxfordjournals.org.
- NEVES, A. L. R.; LACERDA, C. F.; GUIMARÃES, F. V. A.; HERNANDEZ, F. F. F.; SILVA, F. B. DA.; PRISCO, J. T.; GHEYI, H. R. Acumulação de biomassa e extração de nutrientes por plantas de feijão-de-corda irrigadas com água salina em diferentes estádios de desenvolvimento. *Revista Ciência Rural*, v.39, p.758-765, 2009
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira, São Paulo: CitrusBR, 2011. 138p.

NIEVES-CORDONES, M., MARTINEZ, V., BEGOÑA, B., RUBIO, F.. Comparison between Arabidopsis and Rice for Main Pathways of K⁺ and Na⁺ Uptake by Roots. *Frontiers in Plant Science* v. 7, n. July, p. 1–14 , 2016.

NIU, G., XU, W., RODRIGUEZ, D., SUN, Y. Growth and Physiological Responses of Maize and Sorghum Genotypes to Salt Stress. *ISRN Agronomy* v. 2012, n. May 2014, p. 1–12 , 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/145072/>>.

OMISUN, TAKHELLAMBAM SMITA SAHOO¹ & BEDABRATA SAHA¹ & SANJIB KUMAR PANDA¹ Relative salinity tolerance of rice cultivars native to North East India: a physiological, biochemical and molecular perspective. *Protoplasma* p. 1–10 , 2017.0070901711428.

PANDEY, G.K. (2015). Elucidation of Biotic Stress Signaling in Plants: Functional Genomics Perspective, *Vol.1 and 2*. New York, NY: Springer + Business media.

PANDEY, Girdhar K. *et al.* **Editorial: Abiotic Stress Signaling in Plants: Functional Genomic Intervention**. [S.l.: s.n.], 2016. 681 p. 7 v.

PANDOLFI, C., AZZARELLO, E., STEFANO, S., SHABALAA, S. Acclimation improves salt stress tolerance in Zea mays plants. *Journal of Plant Physiology* v. 201, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2016.06.010>>.

PAREEK, C., S., SMO CZYNSKI, R., TRETYN, A. Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics* v. 52, n. 4, p. 413–435, 2011.1335301100.

PARIDA, A. K., & DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324–349. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010>

PARIDA, Asish K; VEERABATHINI, Sairam K; KUMARI, Asha; AGARWAL, Pradeep K. Physiological, Anatomical and Metabolic Implications of Salt Tolerance in the Halophyte *Salvadora persica* under Hydroponic Culture Condition. *Frontiers in Plant Science* v. 7, n. March, p. 1–18, 2016.

PARIHAR, Parul; SINGH, Samiksh; SINGH, Rachana; SINGH, Vijay Pratap; PRASAD, Sheo Mohan. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research* v. 22, n. 6, p. 4056–4075, 2015.

PENG, Zhen *et al.* Na⁺ compartmentalization related to salinity stress tolerance in upland cotton (*Gossypium hirsutum*) seedlings. *Nature Publishing Group* n. October, p. 1–14 , 2016.

PEREIRA, A. Plant Abiotic Stress Challenges from the Changing Environment. *Frontiers in Plant Science*, 7(July), 2013–2015. *Physiol. Plantarum*.83: 463-468. 2016.

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

PRISCO, J.T., GOMES-FILHO, E., MIRANDA, R. DE S. Physiology and biochemistry of plants growing under salt stress. . *Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados*. Capítulo 12. ISBN 978-85-420-0948-4 Fortaleza - CE, 2016.

QU, C., LIU, C., GUO, F., HU, C., ZE, Y., LI, C., ZHOU, Q., HONG, F. Improvement of cerium on photosynthesis of maize seedlings under a combination of potassium deficiency and salt stress. **Biological Trace Element Research** v. 155, n. 1, p. 104–113 , 2013.1559-0720 (Electronic)r0163-4984 (Linking).

REDDY, Inja Naga Bheema Lingeswara *et al.* Salt Tolerance in Rice: Focus on Mechanisms and Approaches. **Rice Science** v. 24, n. 3, p. 123–144, 2017.

ROBINSON, Mark D.; MCCARTHY, Davis J.; SMYTH, Gordon Keith. EdgeR: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data. **Bioinformatics**, 26, 139-140. 2010. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

ROBINSON, C., D. A. BARRY, P. MCCARTY, J. I. Gerhard and I. Kouznetsova. pH control and buffer addition for enhanced source zone bioremediation of chlorinated solvents, **Science of the Total Environment**, 407, 4560 - 4573, 2009.

ROY, Stuart J.; NEGRÃO, Sónia; TESTER, Mark. Salt resistant crop plants. **Current Opinion in Biotechnology** v. 26, p. 115–124 , 2014.0958-1669.

SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463–5467

SCHRODER, K., G. P. GASPARINI, M. TANGHERLINI, AND M.ASTRALDI. Deep and intermediate water in the western Mediterranean under the influence of the Eastern Mediterranean Transient, *Geophys. Res. Lett.*,33, 2006. L21607,doi:10.1029/2006GL027121.

SEO, Eunyong; CHOI, Doil. Functional studies of transcription factors involved in plant defenses in the genomics era. v. 14, n. April 2015, p. 260–267 , 2017.

SEWELAM, Nasser; KAZAN, Kemal; SCHENK, Peer M. Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road. **Frontiers in Plant Science** v. 7, n. February, p. 1–2 , 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00187/abstract>>.1664-462X.

SHAM, Arjun *et al.* Identification of Arabidopsis candidate genes in response to biotic and abiotic stresses using comparative microarrays. **PLoS ONE** v. 10, n. 5, p. 1–21 , 2015.

SHEN, Jiabin; LV, Bo; LUO, Liqiong; HE, Jianmei; MAO, Chanjuan; XI, Danda; MING, Feng. The NAC-type transcription factor OsNAC2 regulates ABA-dependent genes and abiotic stress tolerance in rice. **Scientific Reports**. January, p. 1–14 , 2017.

SHU, Kai *et al.* Salt Stress Represses Soybean Seed Germination by Negatively Regulating GA Biosynthesis While Positively Mediating ABA Biosynthesis. **Frontiers in Plant Science** v. 8, n. August, p. 1–12, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.01372/full>>.

SHUKLA, Pushp Sheel; AGARWAL, Parinita; GUPTA, Kapil; AGARWAL, Pradeep. Molecular characterization of an MYB transcription factor from a succulent halophyte involved in stress tolerance. **AOB plants** n. October, p. 1–13 , 2017.

SIDDIQUI, A.D.D., MOHAMMAD GOLAM MOSTOFA A, MST. MAHMUDA AKTER B, ASHISH KUMAR SRIVASTAVA C, MD. ABU SAYED D,M. SHAMIM HASAN E, LAMSON PHAN TRAN IMPACT of salt-induced toxicity on growth and yield-potential of local wheat cultivars: oxidative stress and ion toxicity are among the major determinants of salt-tolerant capacity. **Chemosphere** v. 187, p. 385–394 , 2017.

SINGH, B.B. (2005) Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) walp). In: Singh RJ, Jauhar PP (eds) **Genetic resources, chromosome engineering and crop improvement**, CRC Press, pp 117–162

SINGH, MADHULIKA JITENDRA KUMAR . SAMIKSHA SINGH VIJAY PRATAP SINGH . SHEO MOHAN PRASAD. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology** v. 14, n. 3, p. 407–426 , 2015.

SOBREIRA, A. C. M., MAIA, Y., REBOUÇAS, D. M., FONTENELE, N.M.B., COSTA, J. H., OTOCH, M. L. O., OLIVEIRA, L.M. N., ORELLANO, E. G., DE MELO, D.F. Vacuolar proton pumps regulation during development of *Vigna unguiculata* seedlings under salt stress. **Theoretical and Experimental Plant Physiology** v. 26, n. 3–4, p. 167–175 , 2014.4062601400.

SONG, L., PRINCE, S., VALLIYODAN, B., JOSHI, T., MALDONADO DOS SANTOS, J. V., *et al.* Genome-wide transcriptome analysis of soybean primary root under varying water-deficit conditions. **BMC Genomics** p. 1–17 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2378-y>>.1286401623.

SORNARAJ, P., *Luang, S., Lopato, S., Hrmova, M.* Basic leucine zipper (bZIP) transcription factors involved in abiotic stresses: A molecular model of a wheat bZIP factor and implications of its structure in function. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects** v. 1860, n. 1, p. 46–56 , 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.014>>.0304-4165.

SOUSA, C. H. C; LACERDA, C. F; BEZERRA, F. M. L.; GOMES FILHO, E; GHEYI, H. R; SOUSA, A. E. C; Sousa, G. G. Respostas morfofisiológicas de plantas de sorgo, feijão-de-corda e algodão sob estresse salino. *Agropecuária Técnica (UFPA)*, v. 31, p. 29-36, 2010. SOUZA, R. P., Machado, E.C., Silveira, J.A.G., Ribeiro, R.V . Fotossíntese e acúmulo de solutos em feijoeiro caupi submetido ?? salinidade. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** v. 46, n. 6, p. 587–592 , 2011.

SUO, J., ZHAO, Q., DAVID, L., CHEN, S., DAI, S. Salinity response in chloroplasts: Insights from gene characterization. **International Journal of Molecular Sciences** v. 18, n. 5, 2017.

TAÏBI, K., *TAÏBI A. F., ABDERRAHIMA, L.A., AMELENNAJAH, B., BELKHODJA, M. C., MULET, J.M. D.* (2016). Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid

peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. **South African Journal of Botany** v. 105, p. 306–312 ,

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 2013. 5.ed. Porto Alegre:Artemed, .954p.

TIETZ, Stefanie *et al.* NPQ(T): a chlorophyll fluorescence parameter for rapid estimation and imaging of non-photochemical quenching of excitons in photosystem-II-associated antenna complexes. **Plant Cell and Environment** v. 40, n. 8, p. 1243–1255 , 2017.1365-3040.

TIMKO MP, EHLERS JD, ROBERTS PA (2007) Cowpea. In: Kole C (ed) *Genome mapping and molecular breeding in plants: pulses, sugar and tuber crops*. Springer, Berlin, pp 49–6

TOUNSI, Sana *et al.* Salt stress reveals differential physiological, biochemical and molecular responses in *T. monococcum* and *T. durum* wheat genotypes. **Physiology and Molecular Biology of Plants** v. 23, n. 3, p. 517–528 , 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12298-017-0457-4>>.

TURAN, Satpal; TRIPATHY, Baishnab C. Salt-stress induced modulation of chlorophyll biosynthesis during de-etiolation of rice seedlings. **Physiologia Plantarum** v. 153, n. 3, p. 477–491,.1399-3054. 2015.

TUTEJA, Narendra. Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling. **Plant Signaling & Behavior** 2:3, 135-138; May/June 2007n. June, p. 135–138 , 2007.

URANO, Kaoru *et al.* Analysis of plant hormone profiles in response to moderate dehydration stress. **Plant Journal** v. 90, n. 1, p. 17–36 , 2017.4955139574. doi: 10.1111/tbj.13460

VASCONCELOS, Maria. Salinização do solo em áreas irrigadas : Aspectos físicos e químicos. **Agropecuária Científica no semiárido** v. 10, n. 1, p. 20–25 , 2014.

VENTER, J.C.; ADAMS, M.D.; MYERS, E.W. ET AL - The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-51, 2001.

VIGHI, I. L. *et al.* Functional characterization of the antioxidant enzymes in rice plants exposed to salinity stress. **Biologia Plantarum** v. 61, n. 3, p. 540–550 , 2017.

VISHWAKARMA, Kanchan *et al.* Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. **Frontiers in Plant Science** v. 8, n. February, p. 1–12 , 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00161/full>>.

WALTER FILHO, W. DOS S. S., HANS R. GHEYI ,H. R., MARCOS E. B. BRITO,M. E.B., NOBRE, R.G., FERNANDES, P.D., MIRANDA, R. DE S.(2016). Melhoria genética e seleção de cultivares tolerantes à salinidade. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados** ISBN, 2016.9788542009484. Fortaleza – CE.

WANG, H., WANG, H., SHAO, H., TANG, X. Recent Advances in utilizing Transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. *Frontiers in Plant*

Science. v.7, February, p.1-13, 2016. Disponível em

<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00067/abstract.1664-462X>.

WANG, Hongyan *et al.* Recent Advances in Utilizing Transcription Factors to Improve Plant Abiotic Stress Tolerance by Transgenic Technology. **Frontiers in Plant Science** v. 7, n.

February, p. 1–13 , 2016. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00067/abstract>>.1664-462X.

WANG, N., QI, H., G QIAO, W., N SHI, J., XU, Q., ZHOU, H., YAN, G., HUANG, Q. Relative contribution of Na + /K + homeostasis, photochemical efficiency and antioxidant defense system to differential salt tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars.

Plant Physiology and Biochemistry v. 119, p. 121–131 , 2017.

WANG, W-S., XIU-QIN, Z., MIN, L., LI-YU, H., JIAN-LONG, X., FAN, Z., YAN-RU, C., BIN-YING, F., ZHI-KANG, L. (2016A). Complex molecular mechanisms underlying seedling salt tolerance in rice revealed by comparative transcriptome and metabolomic profiling. **Journal of Experimental Botany** v. 67, n. 1, p. 405–419,

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics** v. 10, n. 1, p. 57–63 , 2009. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg2484>>.1471-0064 (Electronic)r1471-0056 (Linking).

WANI, S.H., KUMARB, V., SHRIRAMC, V., SAHD, S.K. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. **The Crop Journal** v. 4, n. 3, p. 162–176 , 2016.

WEI, Y., XU, Y., LU, P., WANG, X., LI, Z., CAI, X., ZHOU, Z., WANG, Y., ZHANG, Z., LIN, Z., LIU, F., WANG, K. Salt stress responsiveness of a wild cotton species (*Gossypium klotzschianum*) based on transcriptomic analysis. **PLoS ONE** v. 12, n. 5, p. 1–25 ,

2017.111111111111.

WELBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a e b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144, p.307-313, 1994.

WOLF, J. B.W. Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: An RNA-seq tutorial. **Molecular Ecology Resources** v. 13, n. 4, p. 559–572 , 2013.0046184716.

XIONG, H. GUO, H., XIE, Y., ZHAO, L., GU,J., ZHAO, S., LIU, L. RNAseq analysis reveals pathways and candidate genes associated with salinity tolerance in a spaceflight-induced wheat mutant. **Scientific Reports** v. 7, n. 1, p. 2731 , 2017

YAMORI, WATARU; MAKINO, AMANE; SHIKANAI, TOSHIHARU. A physiological role of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis under fluctuating light in rice. **Nature Publishing Group** n. December 2015, p. 1–12 , 2016.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep20147>>.

YANG, C.; ZHAO, Long; ZHANG, Huakun; YANG, Zongze; WANG, Huan; WEN, Shanshan; ZHANG, Chunyu; RUSTGI; WETTSTEIN, ; LIU, Bao. Evolution of physiological

responses to salt stress in hexaploid wheat. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 111, n. 32, p. 11882–11887. 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1412839111>>.0027-8424..

YANG, Tongren; YAO, Sufei; HAO, Lin; ZHAO, Yuanyuan; LU, Wenjing; XIAO, Kai. Wheat bHLH-type transcription factor gene TabHLH1 is crucial in mediating osmotic stresses tolerance through modulating largely the ABA-associated pathway. **Plant Cell Reports** v. 35, n. 11, p. 2309–2323, 2016.

YANG, Z., WANG, Y., WEI, X., ZHAO, X., WANG, B., SUI, N. Transcription Profiles of Genes Related to Hormonal Regulations Under Salt Stress in Sweet Sorghum. **Plant Molecular Biology Reporter**. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11105-017-1047-x>>. 2017.

YOSHIDA, Y., MARUBODEE, R., OGISO-TANAKA, E., ISEKI, K., ISEMURA, T., TAKAHASHI, Y., MUTO, C., KEN NAITO, K., KAGA, A., OKUNO, K., EHARA, H., TOMOOKA, N. Salt tolerance in wild relatives of adzuki bean, *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi. **Genetic Resources and Crop Evolution** v. 63, n. 4, p. 627–637, 2016.0925-9864.

YOU, Jun; CHAN, Zhulong. ROS Regulation During Abiotic Stress Responses in Crop Plants. **Frontiers in Plant Science** v. 6, n. December, p. 1–15, 2015.

YUAN, R.N., SHU, S., GUO, S.R., SUN, J., WU, Q. (2017). The positive roles of exogenous putrescine on chlorophyll metabolism and xanthophyll cycle in salt-stressed cucumber seedlings. v. 55, n. X, p. 1–10. **PHOTOSYNTHETICA**.

YUANHANG, Fei *et al.* Hierarchical Bayesian models for predicting soil salinity and sodicity characteristics in a coastal reclamation region. **Ecological Engineering** v. 104, p. 45–56, 2017.

ZHANG, D., WANG, F., DONG, S., LU, Y. (2016a). De novo assembly and transcriptome analysis of osmoregulation in *Litopenaeus vannamei* under three cultivated conditions with different salinities. **Gene** v. 578, n. 2, p. 185–193.

ZHANG, F., ZHU, G., DU, L., SHANG, X., CHENG, C., YANG, B. ET AL. (2016b). Genetic regulation of salt stress tolerance revealed by RNA-Seq in cotton diploid wild species, *Gossypium davidsonii*. **Scientific Reports** v. 6, n. 1, p. 20582.

ZHANG, R., CALIXTO, C.P.G., MARQUEZ, Y., VENHUIZEN, N., Tzioutziou, A., GUO, W., SPENSLEY, M., ENTIZNE, J.C., LEWANDOWSKA, D., HAVE, S.T., FREY, F.HIRT, H., JAMES, A.B., NIMMI, H.G., BARTA, A., KALYNA, M., BROWN, J.W.S. (2017). A high quality *Arabidopsis* transcriptome for accurate transcript-level analysis of alternative splicing. **Nucleic Acids Research** v. 45, n. 9, p. 5061–5073.

ZHANG, Yan-Min; ZHANG, Hong-Mei; LIU, Zi-Hui; LI, Hui-Cong; GUO, Xiu-Lin; LI, Guo-Liang. The wheat NHX antiporter gene TaNHX2 confers salt tolerance in transgenic alfalfa by increasing the retention capacity of intracellular potassium. **Plant Molecular Biology**. p. 50051, 2015.

ZHANG, Xia *et al.* Comparative transcriptome analysis of the Asteraceae halophyte *Karelinia caspica* under salt stress. **BMC Research Notes** v. 7, n. 1, p. 927 , 2014. Disponível em: <<http://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-0500-7-927>>.1756-0500.

ZHAO, S., FUNG-LEUNG, W., BITTNER, A., NGO, K., LIU, X. 2014. Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. **PLoS ONE** v. 9, n. 1, 1932-6203.

ZHOU, L., WANG, N. N., GONG, S. Y., LU, R., LI, Y., AND LI, X. B. (2015). Overexpression of a cotton (*Gossypium hirsutum*) WRKY gene, *GhWRKY34*, in *Arabidopsis* enhances salt-tolerance of the transgenic plants. *Plant Physiol. Biochem.* 96, 311–320. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.08.016

Tabela S1 – Genes diferencialmente expressos (GDEs) (p -value < 0,01) nas folhas de plantas de *Vigna unguiculata*, genótipos Pitiúba e TVU, após 1 e 10 dias de estresse salino com NaCl a 100 mM. O nível de modulação dos GDEs está apresentado com os valores de \log_2 fold change. PC – Pitiúba controle; PS – Pitiúba sal; TC – TVU controle; e TS – TVU sal. Marcação em azul = aumento na expressão; Marcação em vermelho = redução na expressão.

Gene	Nº identificação	Comparação					
		PC x PS	TC x TS	PS x TS	PC x PS	TC x TS	PS x TS
		1 dia			8 dias		
FOTOSSÍNTESE							
ABC transporter I family member 6	TR44067 c0_g1						-7,65
Clp protease ATP-binding subunit CLPT1, chloroplastic	TR54446 c0_g3					-8,05	
Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase	TR10528 c0_g2				7,65		
CAJ1-like isoform X1	TR25185 c0_g3						-8,01
Ferritin-3, chloroplastic	TR78581 c0_g4				10,35	10,35	
Ferritin-3, chloroplastic	TR78581 c0_g3				10,34	10,34	
Ferritin-3, chloroplastic	TR78581 c0_g1				-11,27	-10,93	
FT-interacting protein 1	TR13546 c0_g2				-9,19	-9,32	
Glutamyl-tRNA reductase (GluTR)-binding protein	TR8627 c0_g2			8,17			
Light-harvesting complex I chlorophyll A/B-binding protein mRNA	TR354 c0_g1	8,18		8,17			
NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit S, chloroplastic	TR48454 c0_g1				7,81		
NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit N, chloroplastic	TR41120 c0_g1		-7,91				
Outer envelope pore protein 16-3, chloroplastic/mitochondrial	TR29320 c0_g3		-3,85				

		PC x PS	TC x TS	PS x TS	PC x PS	TC x TS	PS x TS
		1 dia			8 dias		
Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic-like	TR57499 c8_g2	10,50	10,50				
Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic-like	TR57499 c8_g9	-8,36	8,36	8,36			
Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic-like	TR71684 c9_g2				11,62	11,61	
Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic-like	TR57499 c8_g8		-12,15			-12,33	
Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic-like	TR57499 c8_g5					11,22	11,22
Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic-like	TR57499 c8_g6	7,96					
Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic-like	TR57499 c8_g4						-10,97
Pentatricopeptide repeat-containing protein	TR21144 c0_g1			-8,01			
PGR5-like protein 1A	TR57929 c0_g1	-9,55		9,46			
PGR5-like protein 1A	TR57929 c0_g2				-9,86		9,83
Phosphoglucomutase, chloroplastic	TR25754 c0_g2	3,89				-9,00	-8,29
Phosphoglycerate kinase, cytosolic	TR23596 c0_g2	8,29	9,34				
Phosphoglycerate kinase, cytosolic	TR23596 c0_g3			8,53			
Phospholipase A1-lidelta	TR40998 c0_g6				-10,20		
Phospholipase A1-lidelta	TR40998 c0_g5	-9,17	8,33	8,32	9,85		
Photosystem II core complex proteins psbY, chloroplastic-like	TR3270 c0_g2	7,87					
Photosystem II core complex proteins psbY, chloroplastic	TR8249 c0_g2				7,76		
Phytoene dehydrogenase (PDS), chloroplastic/chromoplastic	TR21723 c0_g2						7,91
Replicase poly 1a	TR26741 c0_g2					8,56	

		PC x PS	TC x TS	PS x TS	PC x PS	TC x TS	PS x TS
		1 dia			8 dias		
Stress response protein nst1	TR27726 c0_g2				-9,15	10,17	10,17
Stromal processing peptidase; zinc protease pqqL	TR30437 c0_g1	8,84		-8,84			
Uroporphyrinogen decarboxylase	TR18418 c0_g2				-3,4		
REPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO							
Alcohol dehydrogenase	TR42131 c0_g2			7,71		7,71	
BON1 -associated protein 2-like	TR34220 c0_g2		9,76	9,75			
Catalase	TR85763 c9_g2				4,93		-3,89
Chloroplastic lipocalin	TR1201 c0_g2		7,65	7,65			
DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 37-like	TR41373 c0_g1						8,73
Glutathione peroxidase 5	TR23676 c0_g1				-7,96		8,13
L-galactose dehydrogenase	TR12277 c0_g1	7,82					
NADPH--cytochrome P450 reductase	TR3305 c0_g2	8,47					
VIAS DE SINALIZAÇÃO/ FATORES DE TRANSCRIÇÃO							
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 homolog A	TR16595 c0_g2			7,65			
26S protease regulatory subunit 8 homolog A	TR23992 c0_g2	-4,69					
BASIC PENTACYSSTEINE2-like	TR56801 c0_g10					-7,71	
BTB/POZ domain-containing protein	TR27606 c0_g2		7,82				
Casein kinase I-like	TR53615 c1_g2		7,96	7,96			
CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 3-like (CIPK)	TR46607 c1_g5		8,43	8,43			

		PC x PS	TC x TS	PS x TS	PC x PS	TC x TS	PS x TS
		1 dia			8 dias		
CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 14-like (CIPK)	TR4434 c0_g1			7,81			
Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1	TR32600 c0_g2				9,29		
E3 ubiquitin-protein ligase SDIR1 isoform X2	TR38569 c0_g1			-7,65			
EIN3-binding F-box protein 1-like	TR43677 c0_g2			9,92		9,92	
E3 ubiquitin-protein ligase rbrA	TR31051 c0_g2	-8,78					
Ethylene response sensor 1-like	TR31141 c0_g2	9,95					
Ethylene-responsive transcription factor 1A-like	TR38364 c3_g1		3,95				
F-box protein CPR30-like	TR1662 c0_g1						8,21
Gamma aminobutyrate transaminase (GABA-T) 3	TR17645 c0_g2			-7,71			
Initiation factor 4A-10-like	TR43710 c2_g2				9,11		
Interferon-related developmental regulator 1-like	TR47979 c1_g3		7,96				
Interferon-related developmental regulator 1-like	TR47979 c1_g2		-7,86				
LOB domain-containing protein 37	TR2158 c0_g1	-8,17					
Membrane steroid-binding protein 1 (MSBP1)-like	TR15341 c0_g2	-8,05					
Mitogen-activated protein kinase kinase 9-like (MAPKK)	TR24001 c0_g1				7,86		-7,86
MLO-like protein 1	TR25741 c0_g2						-8,13
NAC domain-containing protein 2-like	TR6212 c0_g1				7,65		
Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 (NOLC1)	TR36077 c0_g1					8,01	8,01
Nuclear transcription factor Y subunit C-1 (NTFY)	TR31685 c1_g1			-7,82			

		PC x PS	TC x TS	PS x TS	PC x PS	TC x TS	PS x TS
		1 dia			8 dias		
Nuclease HARBI1	TR8105 c0_g1	-8,09		9,17	-8,36		
Protein phosphatase 2C 27 (PP2C27)	TR43818 c0_g1	7,71					
Protein SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1	TR34102 c0_g4	8,22		-8,22	-9,13		
Pyruvate dehydrogenase E1 (subunit alpha) mitochondrial)	TR6147 c0_g1		9,09				
Receptor homology region, RING domain-containing protein 2	TR13192 c0_g2			-7,96			
Receptor-like protein kinase	TR33304 c1_g3	7,82					
Receptor protein kinase ZmPK1	TR27753 c0_g3	-8,73	8,40	8,39			
Receptor protein kinase ZmPK1	TR27753 c0_g2					8,13	
RNA-binding protein 33	TR24839 c1_g3				-8,40		
RNA-binding protein 39-like	TR97231 c0_g1			-8,36			
SNF1-related protein kinase regulatory subunit gamma-1	TR8318 c0_g2	8,05					
Transcription factor bHLH128-like	TR31323 c0_g3		-5,60				
Transcription factor bHLH3	TR32679 c0_g2		-7,71	-8,25			
Transcription factor bHLH3	TR32679 c0_g3				8,56		
Transcription factor MYB1R1	TR1162 c0_g1						7,81
Transcription factor TCP14-like	TR97109 c0_g2					8,78	8,78
Transcription factor TCP14-like	TR97109 c0_g1					-8,84	-9,09
Translation initiation factor IF-3-like	TR21109 c0_g4					8,01	
Translation initiation factor 4G-like isoform X1	TR21884 c0_g3			9,49			

		PC x PS	TC x TS	PS x TS	PC x PS	TC x TS	PS x TS
		1 dia			8 dias		
Trihelix transcription factor GTL2-like	TR31180 c0_g2				7,71		-7,71
WRKY transcription factor 15 isoform X1	TR35646 c0_g4		8,71	8,70			
WRKY transcription factor 15 isoform X1	TR35646 c0_g2		-9,51	-9,62			
Zinc finger CCCH domain-containing protein 23-like	TR34800 c4_g3			-8,05			
Zinc finger CCCH domain-containing protein 23-like	TR34800 c4_g5			7,65			
Zinc finger CCCH domain-containing protein 1	TR56684 c2_g13						8,05
FITOHORMÔNIOS							
1-aminociclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO)	TR78458 c5_g2	-6,14	5,98	7,38	4,99		-3,78
1-aminociclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 4 (ACO)	TR8688 c0_g4				7,71		
1-aminociclopropane-1-carboxylate oxidase 5 (ACO)	TR14988 c0_g1						-8,09
Auxin response factor 2	TR27827 c0_g2	9,23	-10,13	-9,23			
Auxin response factor 2	TR27827 c0_g3						8,17
Auxin response factor 19	TR50382 c2_g2				8,21		
Auxin-responsive protein IAA14-like	TR85880 c1_g1		9,66			-10,19	-10,19
Auxin-responsive protein IAA14-like	TR85880 c1_g2			-10,76			
Calcium-dependent protein kinase 10-like	TR72474 c0_g1				7,96		-7,96
Calcium-dependent protein kinase 10-like	TR72474 c0_g4				-7,76		8,21
Gibberellin receptor GID1B-like	TR92673 c0_g1		8,09	8,09			
Gibberellin receptor GID1B-like	TR92673 c0_g3					7,71	7,71

		PC x PS	TC x TS	PS x TS	PC x PS	TC x TS	PS x TS
		1 dia			8 dias		
Gibberellin receptor GID1B-like	TR92673 c0_g4					-8,93	-7,76
Linoleate 13S-lipoxygenase 2-1, chloroplastic-like	TR18682 c0_g2				7,65		-7,65
Pentatricopeptide repeat-containing protein	TR19438 c0_g4						-8,86
Peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein	TR21258 c0_g2		8,65				
Protein TIFY 6B-like isoform X1	TR19475 c0_g1		7,71				
Protein PIN-LIKES 2	TR41637 c0_g5						7,76
HOMEOSTASE IÔNICA							
Amino acid permease 6-like	TR21875 c0_g2	8,14					
Amino acid permease 7	TR25777 c0_g1		-8,29	-7,96			
ATPase subunit 6	TR43321 c1_g3				-9,51		9,65
Cationic amino acid transporter 2, vacuolar isoform X1	TR25904 c0_g1					7,81	
Cationic amino acid transporter 9, chloroplastic isoform X2	TR41744 c0_g3				7,76		-7,76
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	TR34622 c0_g1					-7,86	
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	TR34622 c0_g2						7,76
Monosaccharide-sensing protein 2	TR9709 c0_g1					-8,86	-8,73
Outer envelope pore protein 16-3, chloroplastic/mitochondrial	TR30443 c0_g2				-7,81		
Potassium transporter 2	TR33846 c0_g1					8,76	
Potassium transporter 2	TR33846 c0_g2		7,76	7,76			
Potassium transporter 8-like	TR94988 c0_g2						7,59

		PC x PS	TC x TS	PS x TS	PC x PS	TC x TS	PS x TS
		1 dia			8 dias		
Plastidic ATP/ADP-transporter-like	TR8319 c0_g1				7,71		
Protein SRC2-like	TR43889 c1_g1					8,89	
Protein SRC2-like	TR43889 c1_g3				8,21	-8,73	-8,21
Protochlorophyllide-dependent translocon component 52	TR35230 c0_g1		8,22				
Trafficking protein particle complex subunit 5	TR26727 c0_g2	8,01		-8,01			7,91
Transmembrane emp24 domain-containing protein p24	TR38655 c0_g1	8,09	-8,13	-8,09			
OUTROS/ HOMEOSTASE BIOQUÍMICA							
5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	TR37633 c0_g2					-8,81	-8,33
40S ribosomal protein S5	TR30373 c0_g2				8,09		
Acetolactate synthase 3, chloroplastic-like	TR38972 c0_g4		-8,25				
ALG-2 interacting protein X	TR34984 c0_g2						8,21
Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 6	TR41818 c0_g3				7,86		-7,86
Ankyrin repeat domain-containing protein 30A-like	TR25484 c0_g1					7,76	
Aspartic proteinase nepenthesin-2	TR30994 c0_g1			-8,01		-7,71	-8,59
Basic 7S globulin 2-like	TR21182 c0_g1	-8,05		8,32			
BSD domain	TR8244 c0_g2	8,14		-8,14			
BURP domain protein RD22-like	TR32697 c0_g3	-7,65					
CLPTM1-like membrane protein cnrB	TR30577 c0_g2	7,87					
Coronatine-insensitive protein 1-like	TR42328 c0_g2					8,21	

		PC x PS	TC x TS	PS x TS	PC x PS	TC x TS	PS x TS
		1 dia			8 dias		
Coronatine-insensitive protein 1-like	TR42328 c0_g1					-7,96	
Cullin-4	TR4692 c0_g1						-7,71
Cullin-3A-like	TR48140 c0_g1				-7,65		
Cysteine synthase-like isoform X1	TR20672 c0_g2					-8,29	
Cysteine synthase-like isoform X1	TR20672 c0_g3					7,71	
Cytochrome c oxidase subunit 6b-1-like	TR7321 c0_g2					8,13	8,13
DDRGK domain-containing protein 1	TR12359 c0_g2				7,96		-7,96
Delta(24)-sterol reductase	TR1948 c0_g2				-7,86		
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2 isoform X3	TR46920 c0_g2				7,86		-7,86
Endo-1,3;1,4-beta-D-glucanase-like	TR21042 c0_g1	8,62	8,62				
Endo-1,3;1,4-beta-D-glucanase-like	TR21042 c0_g2	-9,07	-8,86				
Endoglucanase 25	TR2253 c0_g1					8,67	
Endoglucanase 25	TR2253 c0_g2			-9,13	-8,56		8,46
Enoyl-CoA delta isomerase 1, peroxisomal-like	TR54475 c3_g10					7,71	
Glucomannan 4-beta-mannosyltransferase 2	TR23822 c0_g1				-8,53		
Glucose--fructose oxidoreductase isoform X2	TR37625 c1_g3				-7,71		
GTP diphosphokinase RSH2, chloroplastic	TR23837 c1_g1			8,21			
GTP-binding protein SAR1A	TR20751 c0_g1						-7,81
Glycine-rich cell wall structural protein 1-like	TR56742 c0_g1				8,59		-8,59

		PC x PS	TC x TS	PS x TS	PC x PS	TC x TS	PS x TS
		1 dia			8 dias		
Glycine-rich cell wall structural protein 1-like	TR56742 c0_g2	-8,00		7,81	-8,36		8,81
Glycine-rich cell wall structural protein	TR30772 c0_g1		8,05				
Glycine-rich cell wall structural protein 1.8	TR33358 c0_g1	-8,17	7,71	7,71			
Glycine-rich cell wall structural protein 1.8	TR33358 c0_g2	8,25	-8,40	-8,25			
Glyoxylate/succinic semialdehyde reductase 1	TR2543 c0_g2		-9,86				
Interactor of constitutive active ROPs 3 isoform X2	TR38728 c1_g5					-8,53	-8,05
Lipase-like PAD4	TR49585 c0_g1	7,65		-7,65			
Lipase-like PAD4	TR49585 c0_g2	-7,91					
Long chain acyl-CoA synthetase 8 (LACS8) -lik	TR39833 c1_g1	-8,17					
Long chain acyl-CoA synthetase 9 (LACS9), chloroplastic	TR85672 c0_g2	7,87	7,91				
Long-chain-alcohol oxidase FAO2	TR48409 c0_g4	8,53	-8,76	-8,53			
MAP7 domain-containing 2	TR57793 c0_g2			7,71			
Metallothionein-like protein 2	TR8345 c4_g3	-8,29		8,29			
Metal tolerance protein 1	TR40523 c0_g3						8,68
Metal tolerance protein 11 isoform X1	TR20989 c0_g1	-7,86					
Metal tolerance protein 1	TR40523 c0_g3						8,68
Methionine gamma-lyase	TR1625 c0_g1						7,65
Methylesterase 17-like	TR9413 c0_g2				7,96		-7,96
Methyltransferase PMT16	TR85919 c0_g1		-7,96				

		PC x PS	TC x TS	PS x TS	PC x PS	TC x TS	PS x TS
		1 dia			8 dias		
Methyltransferase PMT16	TR43092 c0_g2				-8,29		
NADH dehydrogenase flavoprotein 1, mitochondrial	TR2542 c0_g2	7,87					
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TR85680 c3_g2	11,85		-11,85			
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TR85680 c3_g3					4,61	4,59
NF-kappa-B-activating protein isoform X1	TR39193 c0_g2		9,53				
NF-kappa-B-activating protein	TR39193 c0_g3	-8,17	-9,38				
Nucleolin 1 isoform X1	TR19535 c0_g2	8,29					
Octicosapeptide phox Bem1p (PB1) domain	TR34051 c0_g6		-4,47			7,65	7,65
Outer envelope membrane protein 7	TR2763 c0_g2		8,25				
Outer envelope membrane protein 7	TR2763 c0_g1		-8,25				
Outer envelope pore protein, chloroplastic/mitochondrial	TR29320 c0_g1		9,09				
Palmitoyl-protein thioesterase 1-like	TR22077 c0_g2	7,96					
Pentatricopeptide repeat-containing protein At2g31400	TR92670 c0_g1					10,63	
Pentatricopeptide repeat-containing protein At2g31400	TR43442 c0_g1		-7,65				
Pentatricopeptide repeat-containing protein At4g31850	TR19438 c0_g3		-8,7	-8,25			
Peroxisomal fatty acid beta-oxidation protein	TR21258 c0_g1		-8,59	-7,91			
Phenolic glucoside malonyltransferase 1-like	TR5995 c0_g2	-8,59					
Polyadenylate-binding protein-interacting protein 3-like	TR57355 c0_g6		7,87	7,86	8,01		-8,01
Polyadenylate-binding protein 1-B-binding protein mRNA	TR30472 c0_g1	-7,91	8,29	8,29			

		PC x PS	TC x TS	PS x TS	PC x PS	TC x TS	PS x TS
		1 dia			8 dias		
Presequence protease 1, chloroplastic/mitochondrial	TR19606 c1_g2		-7,86		-8,21		
Probable acyl-activating enzyme 6 isoform X2	TR42694 c0_g2					-9,23	-8,56
RNA polymerase II transcription subunit 26c isoform X2	TR28657 c0_g1		-8,00				
Probable plastid-lipid-associated protein 4, chloroplastic	TR1582 c0_g1						8,73
Probable serine protease EDA2	TR16972 c0_g2		8,36				
Probable plastid-lipid-associated protein 4, chloroplastic	TR1582 c0_g1						8,73
Proline-rich protein 4-like	TR10983 c0_g1				7,71	-8,53	-7,71
Protein MIZU-KUSSEI 1	TR32782 c0_g1					-9,09	-8,98
Protein MIZU-KUSSEI 1	TR32782 c0_g2		8,36			9,07	9,07
Protein MODIFIER OF SNC1 11	TR49535 c0_g2				7,71		
Protein RCC2 homolog	TR41162 c0_g1		-8,09				
Protein ROOT PRIMORDIUM DEFECTIVE 1	TR22149 c0_g2	-8,29	-8,83				
Protein STRICTOSIDINE SYNTHASE-LIKE 10	TR7781 c0_g1					-8,46	
Dormancy-associated protein homolog 3	TR57488 c0_g6				7,76	8,13	
Protein TPRXL	TR32862 c0_g4	9,70		-9,70			
Pyruvate kinase, cytosolic isozyme	TR27733 c0_g2		7,91				
Related lipid transfer mitochondrial	TR2132 c0_g1	7,65		-7,65			
Repetitive proline-rich cell wall protein 3-like	TR71619 c2_g1				-12,10		12,97
Repetitive proline-rich cell wall protein 3-like	TR71619 c2_g2					-10,42	-10,12

		PC x PS	TC x TS	PS x TS	PC x PS	TC x TS	PS x TS
		1 dia			8 dias		
Repetitive proline-rich cell wall protein 3-like	TR71619 c2_g5	-10,58	-10,60		-10,56		10,52
Ribosomal L1 domain-containing protein 1	TR27908 c0_g2						-7,86
RNA polymerase sigma factor β	TR16530 c0_g2		8,14				
Sarcoplasmic reticulum histidine-rich calcium-binding protein	TR33146 c0_g1					8,05	8,05
SCY1-like protein 2	TR55969 c1_g1				7,65		-7,65
Squalene monooxygenase-like	TR33371 c0_g4				8,17		
Stress induced	TR12965 c0_g1					8,53	
Subtilisin-like protease SBT1.6	TR21357 c0_g2					-7,81	
Transmembrane protein,	TR92727 c0_g2	-10,36	11,36	11,36		10,35	
Tubulin beta-1 chain	TR78352 c3_g2	12,10					
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 28	TR85657 c0_g1		-3,13	-3,09			
YTH domain family 1	TR9307 c0_g2	8,01		-8,01			
DESCONHECIDAS/NÃO CARACTERIZADAS							
Uncharacterized	TR44769 c0_g3	8,09		-8,09	-8,05	-8,50	
Uncharacterized	TR9307 c0_g1	-7,91		8,32			
Uncharacterized	TR56864 c2_g3				8,17	7,65	
Uncharacterized	TR34081 c0_g5				-8,81	-7,65	
Uncharacterized	TR36257 c0_g1				-8,70		8,62
Uncharacterized	TR44769 c0_g2				-8,01	-8,43	

		PC x PS	TC x TS	PS x TS	PC x PS	TC x TS	PS x TS
		1 dia			8 dias		
Uncharacterized	TR21666 c0_g2		-7,71			7,86	7,86
Uncharacterized	TR11321 c0_g2	8,59					
Uncharacterized	TR27320 c0_g3	7,76					
Uncharacterized	TR17008 c0_g1	-8,53					
Uncharacterized	TR19356 c0_g1	-7,86					
Uncharacterized	TR50511 c0_g1	-7,65					
Uncharacterized	TR36257 c0_g2				8,76		
Uncharacterized	TR8752 c0_g2	8,18				-9,76	-8,93
Uncharacterized	TR34081 c0_g2	7,76					-7,59
Uncharacterized	TR21414 c0_g3	7,96					
Uncharacterized	TR6097 c0_g2						-8,46
Uncharacterized	TR9587 c0_g2						7,71
Uncharacterized	TR34081 c0_g4						7,76
Uncharacterized	TR27060 c0_g3			-7,91			
Uncharacterized	TR411 c0_g1						8,78
Uncharacterized	TR8859 c0_g1			-8,33			
Uncharacterized	TR12965 c0_g2					-8,50	
Uncharacterized	TR57488 c0_g2					-8,59	
Uncharacterized	TR771 c0_g1		-7,91				

		PC x PS	TC x TS	PS x TS	PC x PS	TC x TS	PS x TS
		1 dia			8 dias		
Uncharacterized	TR5108 c0_g2		-7,96				
Uncharacterized	TR78526 c1_g3		-10,40				
Uncharacterized	TR21382 c0_g1		7,82				
Uncharacterized	TR5108 c0_g1		8,25				
Uncharacterized	TR78526 c1_g2		12,31				
Uncharacterized	TR41637 c0_g6				-7,71		
Uncharacterized	TR32879 c0_g2				-7,81		
Uncharacterized	TR8061 c0_g1				-7,81		
Uncharacterized	TR56647 c1_g1				-8,81		
Uncharacterized	TR57162 c2_g1				7,65		
Uncharacterized	TR8752 c0_g1		8,25		8,89	10,01	
Uncharacterized	TR6214 c0_g1				9,05	8,05	
Uncharacterized	TR6214 c0_g2				-9,44		8,17

Tabela S2 – Genes que apresentaram expressão diferencial (p -value < 0,01) com o tempo de exposição ao estresse salino. Para cada genótipo, Pitiúba e TVU, os perfis transcriptômicos das folhas das plantas sob estresse dos diferentes tempos foram comparados (1d × 8d). Os valores representam o número de vezes que o gene foi mais expresso em um determinado tempo em relação ao outro.

Gene	Nº Identificação	Pitiúba sal (1d × 8d)		TVU sal (1d × 8d)	
		1d	8d	1d	8d
Universal stress protein A-like protein	TR38096 c0_g2	6,91		6,75	
Carotenoid cleavage dioxygenase 4, chloroplastic	TR34879 c1_g4				20,56
Chlorophyll(ide) b reductase NYC1, chloroplastic	TR33586 c0_g2	6,97		10,43	
Chlorophyll a/b binding protein, partial	TR39715 c0_g1		16,34		15,77
Chlorophyll a-b binding protein 5, chloroplastic	TR39641 c0_g3	13,69			
Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type 1-like	TR47405 c1_g3				7,86
Chlorophyll a-b binding protein 3, chloroplastic	TR44870 c0_g2		14,27		
Chlorophyll a-b binding protein 2, chloroplastic	TR47405 c1_g1				8,17
Light-harvesting complex I chlorophyll A/B-binding protein	TR37425 c0_g7	14,1			
Photosystem II repair protein PSB27-H1, chloroplastic	TR64681 c2_g1		7,09		7,04
Photosystem II 10 kDa polypeptide, chloroplastic	TR36816 c0_g1				14,27
Photosystem II core complex proteins psbY, chloroplastic	TR8249 c0_g2				14,12
Photosystem I subunit O	TR48649 c0_g1		15,28		13,95
psbP domain-containing protein 4, chloroplastic	TR438 c0_g1		13,40		
SLOW GREEN 1, chloroplastic	TR72645 c0_g1	14,48		13,48	

		Pitiúba sal (1d × 8d)		TVU sal (1d × 8d)	
		1d	8d	1d	8d
Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B	TR55616 c0_g5	13,46			
K ⁺ efflux antiporter 2	TR48646 c1_g3	13,22			
PGR5-like protein 1A, chloroplastic	TR57929 c0_g1		15,17		14,94
Sodium/potassium/calcium exchanger 1-like	TR44921 c0_g1	14,46			
V-type proton ATPase catalytic subunit A	TR22228 c0_g2	18,80		9,02	
Abscisic acid 8'-hydroxylase 1-like isoform X2	TR47427 c0_g1	13,63	13,30		
Abscisic acid receptor PYL4-like	TR31002 c0_g2	21,70			
Abscisic acid receptor PYL2-like	TR40533 c0_g1		13,19		
Abscisic acid-insensitive 5-like	TR48731 c0_g1				4,81
Ethylene-responsive transcription factor 6-like	TR38364 c0_g1	7,84			
Ethylene-responsive transcription factor ERF109-like	TR22581 c0_g1			22,32	
AP2/ERF and B3 domain-containing transcription factor	TR64674 c8_g1	6,61			
CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 3-like	TR46607 c1_g5		18,65		
CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 9	TR37003 c0_g2			13,21	
DREB transcription factor	TR20900 c1_g1	11,50			
F-box/kelch-repeat protein SKIP25-like	TR40529 c0_g2	4,50			
bZIP transcription factor 44-like	TR92660 c2_g1	5,67			
bZIP transcription factor 11-like	TR22342 c0_g2			15,89	
MYB transcription factor MYB44	TR20863 c1_g2	15,45			

		Pitiúba sal (1d × 8d)		TVU sal (1d × 8d)	
		1d	8d	1d	8d
MYB transcription factor MYB177	TR52647 c0_g1			16,61	
E3 SUMO-protein ligase SIZ1-like isoform X1	TR46559 c0_g3	13,69			
SUMO-conjugating enzyme SCE1	TR30298 c0_g3			15,20	
DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 50	TR23676 c0_g1	16,28	16,48		
Glutathione peroxidase 5	TR11145 c0_g2	7,52			
Oxidative stress 3, isoform 2	TR39539 c0_g1			10,26	
Peroxidase P7-like (LOC108340507), mRNA	TR47495 c0_g1	8,16			
Peroxidase 44-like (LOC106753859), mRNA	TR41843 c0_g1	16,30		15,69	
Respiratory burst oxidase homolog protein B-like	TR34508 c0_g1	9,08			
S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme	TR44723 c0_g1			7,50	
S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme-like	TR39303 c0_g1	15,57			