

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

ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES DAS BOMBAS DE PRÓTONS (V-ATPase e V-PPase) E DOS CONTRA-TRANSPORTADORES VACUOLARES (NHX) DE *Vigna unguiculata* (L.) Walp SUBMETIDOS A ESTRESSES ABIÓTICOS

ALANA CECÍLIA DE MENEZES SOBREIRA

FORTALEZA

2009

ALANA CECÍLIA DE MENEZES SOBREIRA

ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES DAS BOMBAS DE PRÓTONS (V-ATPase e V-PPase) E DOS CONTRA-TRANSPORTADORES (NHX) VACUOLARES DE *Vigna unguiculata* (L.) Walp SUBMETIDOS A ESTRESSES ABIÓTICOS

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

Área de Concentração: Bioquímica Vegetal

Orientadora: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo

Fortaleza

2009

ALANA CECÍLIA DE MENEZES SOBREIRA

ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES DAS BOMBAS DE PRÓTONS (V-ATPase e V-PPase) E DOS
CONTRA-TRANSPORTADORES (NHX) VACUOLARES DE *Vigna unguiculata* (L.) Walp
SUBMETIDOS A ESTRESSES ABIÓTICOS

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

Aprovada em: 27 de Julho de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. José Hélio Costa

Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Elena Graciela Orellano

IBR-CONICET. Depto. De Biologia Molecular - Universidad Nacional de Rosário

Profa. Dra. Maria de Lourdes Oliveira Otoch

Departamento de Biologia – Universidade Estadual do Ceará

Profa. Dra. Maria Erivalda Farias de Aragão

Departamento de Biologia – Universidade Estadual do Ceará

À minha mãe Mariza...

AGRADECIMENTOS

Essa é uma etapa delicada a ser escrita, pois alguns anos se passaram desde que iniciei o Doutorado em 2004, muitas coisas aconteceram e muitas pessoas participaram em diferentes papéis nessa caminhada. Dessa forma, agradeço a todos que estão presentes em minha memória e que tentarei relatar aqui, mas peço desculpas se por acaso esquecer alguém.

Começo agradecendo a minha mãe Marisa, a quem dedico essa Tese, por todo seu espírito de luta, por sua batalha incansável para formar seus filhos e por querer tanto que eu fosse uma doutora como meus irmãos, mesmo sem entender ao certo o que esse título significa. Agradeço ainda ao meu irmão Cícero Antônio que me recebeu em sua casa durante um longo período me permitindo viver em um ambiente familiar feliz junto com os meus sobrinhos Ana Beatriz e Carlos Arthur. E agradeço ainda a minha irmã Ana Cláudia, minha grande incentivadora, meu exemplo de perseverança e caráter na luta para alcançar seus objetivos, além da minha sobrinha Isadora que tanto me ensina com suas perguntas e observações sempre tão sinceras.

Agradeço de forma muito especial a profa. Dirce que me acompanha desde a iniciação científica e com quem tenho aprendido muito. Obrigado por todos os ensinamentos para a ciência e para vida. Obrigada por ter me acolhido em seu laboratório por todos esses anos e por ter sempre uma palavra de carinho e de entusiasmo mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada pelos conselhos sempre tão pertinentes e pelo exemplo de ética profissional que sempre nos deu. Faltam-me palavras para expressar minha imensa gratidão por tudo que aprendi e por todo carinho recebido durante todos esses anos.

Agradeço a profa. Maria da Guia, que mesmo de longe se preocupa com o nosso desenvolvimento, com o nosso aprendizado e torce por nossas vitórias. E a profa. Denise pelo entusiasmo com a vida e pelo espírito de companheirismo.

A Lourdinha que tem sido amiga, conselheira e incentivadora obrigada por todos os ensinamentos, por ter me apresentado as bombas de prótons e por ter aceitado participar da avaliação desse trabalho.

A Erivalda com quem trabalhei no início da minha caminhada científica, me ensinando os primeiros passos na pesquisa, agradeço por todo incentivo e por aceitar avaliar o meu trabalho.

A profa. Elena o meu muito obrigado por ter aceitado prontamente participar da avaliação desse trabalho, por todo cuidado e atenção durante a correção do manuscrito e por todo carinho que sempre demonstrou ter por mim.

Agradeço ao Hélio por todos os ensinamentos de Biologia Molecular que são a essência desse trabalho e pela disponibilidade em ajudar.

De forma muito especial agradeço ao Prof. Ivan Maia do Departamento de Genética/IB-UNESP pela atenção e pela gentileza em seqüenciar os genes *NHX*.

Aqueles que fazem o laboratório de Bionergética, Neuzinha com o seu bom humor contagiante, Garantizado que tem sempre uma palavra de apoio e otimismo, Pedro que recentemente retornou ao nosso convívio, mas, que já me fez dar muitas risadas com as suas loucuras, João Henrique sempre disposto a ajudar com os experimentos de Biologia Molecular, Welves, Mirele, Bárbara, Georgia, Camila, Carol que foi fundamental me auxiliando nos momentos finais de execução do trabalho, Carine, Andresiane e Marcela tenho muito a agradecer pelos momentos de descontração tão importantes nessa nossa caminhada, proporcionando um ótimo ambiente de trabalho. E de forma muito especial agradeço a Deborah que foi minha fiel companheira, minha colaboradora principalmente em todos os momentos em que estive ausente do laboratório trabalhando em Iguatu e ao amigo Yuri que foi meu maior companheiro durante o desenvolvimento desse trabalho tanto na parte experimental quanto nos momentos finais de elaboração do artigo, sua ajuda foi imprescindível para que esse trabalho se concretizasse. Muito Obrigada!

E por falar em Iguatu, não posso deixar de agradecer a todos que fazem a Faculdade de Educação Ciências e Letras de Iguatu – FECLI que me acolheram desde o final de 2005, onde encontrei um excelente ambiente de trabalho e onde fiz novas amizades. Agradeço de forma especial aos meus alunos, que compreenderam a minha ausência em momentos em que não pude viajar por estar desenvolvendo atividades do Doutorado. Agradeço ao amigo Fernando, companheiro de jornada no curso de Biologia com quem dividi alguns momentos difíceis, mas também muitas vitórias e alegrias que nos deixaram mais maduros. Aos amigos Célio, Saulo, Luciana, Lázara, Jeanne, Hélder, Ana Kelen, Irismaura e Ricardo pelo companheirismo, solidariedade e palavras de incentivo e por todos os momentos de descontração que compartilhamos durante esses anos de trabalho na FECLI. Não posso esquecer os funcionários que se esforçam para nos proporcionar as melhores condições de trabalho possíveis, em especial a Theonilla e Magdalena por todo carinho que vocês sempre me deram.

A minha amiga Erika tenho muito a agradecer, pela amizade construída e consolidada durante todos esses anos de convivência, por ter sempre uma palavra de conforto, e que nos meus momentos de desespero tinha sempre uma palavra de estímulo nunca permitindo que eu desistisse. Obrigada ainda por junto com o Charles me presentear com um afilhado tão especial, o Matheus, um presente na minha vida. Aproveito ainda para agradecer ao Tetei e a Nena que sempre perguntaram sobre a tese, sempre me incentivando e que tanto vibram com as conquistas não só da Erika, mas também de suas amigas. E não posso esquecer a D. Socorro (*in memoriam*), pois tenho certeza que hoje ela está ainda mais feliz com essa conquista.

Em 2008 muitas coisas aconteceram algumas excelentes e outras não tão boas assim. Então como o momento é de alegria falarei apenas das coisas boas e começo rendendo uma homenagem ao carnaval multicultural de Recife, festa alegre e de integração entre os diferentes povos. E nessa festa conheci aquele que veio para mudar, para preencher a minha vida. Se hoje voltei a sonhar é por que estamos juntos, e assim iremos à busca dos nossos sonhos. Alexandre obrigado por fazer parte da minha vida. Te amo!

Agradeço de forma muito especial ao casal de amigos Portil e Deílson que com o tempo admiro cada vez mais. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, me apoiando, me dando forças e que talvez no momento mais difícil da minha vida não permitiram que eu me sentisse só. Obrigada ainda por todos os momentos de alegria que compartilhamos, por vocês transformarem minha casa em nossa casa e preenche-la de carinho e alegria. Obrigada também por me ceder o computador para que eu pudesse escrever minha tese uma vez que já havia queimado dois, muita coragem de vocês...

Outro casal de amigos a quem preciso agradecer é a Bantim e o Arquinério, vocês foram peças fundamentais no processo de transformação da minha vida nesses últimos anos, sem a amizade, o companheirismo e a alegria de vocês teria sido tudo mais difícil. Obrigada ainda por nos presentear em poder conviver com o Cauãzinho, uma criança linda e abençoada que preenche o ambiente de alegria.

A minha amiga Malu que sempre me incentivou, me deu forças e mostrou que mesmo quando tudo parece estar perdido podemos reverter e vencer. Obrigada por todo carinho. A amiga Luciana que mesmo de longe me deu força e incentivo nessa longa batalha o meu muito obrigado. A amiga Gislainy que tem sempre uma palavra de conforto, sempre transmitindo tranquilidade. E ao amigo Nilson que com sua alegria de viver contagia todos a sua volta.

Alguns amigos que mesmo distante não podem ser esquecidos como a Ana Cecília que mesmo não vivendo os seus melhores momentos sempre tem uma palavra de carinho e incentivo. Ao Roberto que mesmo perto, parece longe por conta de tantas obrigações, mas que sempre me estimulou a terminar a tese. Ao Ita, que sempre me incentivou a terminar essa tese e que agora mais perto foi fundamental ao me ajudar a escrever o artigo.

E finalmente agradeço a Deus que me deu forças e permitiu que esse trabalho se concretizasse.

RESUMO

O acúmulo de Na^+ no vacúolo central representa um importante mecanismo de defesa de plantas contra o estresse salino. A regulação dos volumes e conteúdos dos vacúolos de células vegetais depende da atividade de transportadores e canais localizados no tonoplasto (membrana vacuolar). A membrana vacuolar possui duas distintas bombas de prótons (V-ATPase e V-PPase), aquoporinas e vários sistemas de transportes ativos e/ou secundários, como os contra-transportadores Na^+/H^+ vacuolares. As duas bombas de prótons transmembranares funcionam como sistemas de transporte primário nas células vegetais e ambas as enzimas geram uma diferença de potencial eletroquímico de prótons através da membrana vacuolar. Os contra-transportadores vacuolares Na^+/H^+ utilizam o gradiente eletroquímico de prótons gerado pelos transportadores primários para transportar Na^+ para dentro do vacúolo. No presente trabalho inicialmente foram determinados os conteúdos de íons Na^+ e K^+ em raízes, hipocótilos e folhas e em seguida a análise da expressão dos genes das bombas de prótons (*VHA-A*, *VHA-E* e *HVP*) e dos contra-transportadores vacuolares (*NHX2* e *NHX6*) em plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 submetidas a estresse salino e osmótico. As plântulas foram crescidas em meio nutritivo na ausência de NaCl e PEG (controle), na presença de 100 mM de NaCl (estresse salino) ou na presença de 200,67 g/L de PEG (estresse osmótico). O conteúdo de íons Na^+ aumentou em todos os tecidos da planta quando submetidos ao estresse salino (NaCl 100 mM) enquanto que o conteúdo de íons K^+ diminuiu na mesma condição. A expressão dos genes das bombas de prótons e dos contra-transportadores vacuolares de folhas e de raízes no estresse salino aumentou em todas as condições estudadas, porém o aumento foi mais expressivo para os genes da V-PPase, *NHX2* e *NHX6* sugerindo uma regulação paralela entre esses genes. Já no estresse osmótico, os resultados para as folhas mostraram que a expressão dos genes *VHA-A* e *VHA-E* aumentaram enquanto que os outros genes não sofreram mudanças significativas. Nossos resultados sugerem que o estresse salino e o estresse osmótico induziram uma regulação diferenciada em todos os genes sendo o contra-transportador Na^+/H^+ importante na homeostase celular quando as plantas foram submetidas ao estresse salino e osmótico.

Palavras-chave: Bombas de prótons, contra-transportadores vacuolares, *Vigna unguiculata*, estresse salino e estresse osmótico.

ABSTRACT

The accumulation of Na^+ in the central vacuole represents an important mechanism for plants to cope with salt stress. The vacuolar content and the regulations of their volumes in vegetable cells depend on the activity of transporters and channels located in the tonoplast (vacuolar membrane). The vacuolar membrane possesses two different proton pumps (V-ATPase and V-PPase), aquaporine, and systems of primary and secondary transporters like the vacuolar Na^+/H^+ antiporter (NHX). The two transmembrane proton pumps work as systems of primary transport in vegetable cells and both enzymes generate a difference of proton electrochemical potential through the vacuolar membrane which can provide energy to antiport system, $\text{H}^+/\text{substrate}$. The vacuolar Na^+/H^+ antiporter, uses the electrochemical gradient generated by the primary transporters to pump Na^+ ions inward the vacuole. In the present work were first determined the Na^+ and K^+ content followed by the gene expression of the vacuolar proton pumps (*VHA-A*, *VHA-E* and *HVP*) and the vacuolar antiporters (*NHX2* and *NHX6*) from seedlings of *Vigna unguiculata* subjected to salt and osmotic stress. The seedlings were grown on nutritive medium in the absence of NaCl and PEG (control condition), presence of NaCl 100 mM (salt stress) or in the presence of PEG 6000 200,67g.L⁻¹ (osmotic stress). The ion Na^+ content assay showed an increase in all plant tissues when submitted to salt stress, while the K^+ ions decreased in the same condition. The gene expression of the vacuolar proton pumps and the Na^+ antiporter from roots and leaves showed an increase in all studied conditions being more expressive to V-PPase, NHX2 and NHX6 suggesting a coordinated regulation of these genes. The results from leaves showed that *VHA-A* and *VHA-E* were increased, while the others genes tend to remain constant in the osmotic stress. These results suggest that salt and osmotic stress induced a differential regulation of all studied genes, being the vacuolar Na^+ antiporters an important part on keep the cellular homeostasis when the plants were submitted to salt stress.

Keywords: proton pumps, Na^+/H^+ antiporters, *Vigna unguiculata*, salt stress and osmotic stress

ABREVIATURAS

ATP: Adenosinatrifosfato

cDNA: DNA complementar

Cl⁻: Íon cloreto

DNA: Ácido desoxirribonucléico

K⁺: Íon potássio

mRNA: RNA mensageiro

NHX: Contra-transportador vacuolar Na⁺/H⁺

Na⁺: Íon sódio

NaCl: Cloreto de sódio

RNA: Ácido ribonucléico

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

V₁: Domínio periférico de membrana da V-ATPase

V-ATPase: ATPase vacuolar

V₀: Domínio integral de membrana da V-ATPase

VuVHA-A: Subunidade A da V-ATPase de *V. unguiculata* (gene)

VuVHA-E: Subunidade E da V-ATPase de *V. unguiculata* (gene)

V-PPase: Pirofosfatase vacuolar

VuHVP: Pirofosfatase vacuolar de *V. unguiculata* (gene)

VuNHX: Contra-transportador vacuolar de *V. unguiculata* (gene)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mistura de reação de transcrição reversa (RT)	61
Tabela 2: Mistura de reação de PCR	62
Tabela 3: Programa de PCR utilizado para amplificação de cDNA das bombas de prótons e dos contra-transportadores vacuolares de <i>Vigna unguiculatai</i> (L.) Walp	62
Tabela 4. Relação Na^+/K^+ em folhas, hipocótilos e raízes de plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp cv. Vita 5, com 6, 12 e 24 horas sob condição controle e de estresse salino.	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As respostas das plantas ao estresses podem ser tanto em nível celular como no organismo de maneira geral. Estresses constituem sinais ambientais que são recebidos e reconhecidos pelas plantas. Depois do reconhecimento do estresse, o sinal é passado da célula para todo o organismo.	23
Figura 2. Homeostase celular estabelecida após adaptação de plantas ao estresse salino (NaCl)	32
Figura 3. Célula vegetal mostrando um grande vacúolo central.	34
Figura 4. Modelo esquemático de uma V-ATPase de planta proposto por Gaxiola et al., 2007	40
Figura 5. Modelo da topologia da H ⁺ -PPase de membrana da <i>Streptomyces coelicolor</i> proposto por Gaxiola et al., 2007	48
Figura 6. Análise do peso fresco de raízes e hipocótilos de plântulas de <i>V. unguiculata</i> crescidas em solução nutritiva após 6, 12 e 24 horas de exposição ao NaCl 100 mM	69
Figura 7. Conteúdo de Na ⁺ e K ⁺ em raízes de <i>V. unguiculata</i> crescidas em solução nutritiva e analisado em fotômetro de chama após 6, 12 e 24 horas de exposição ao NaCl 100 mM.	70
Figura 8. Conteúdo de Na ⁺ e K ⁺ em hipocótilos de <i>V. unguiculata</i> crescidas em solução nutritiva e analisado em fotômetro de chama após 6, 12 e 24 horas de exposição ao NaCl 100 mM.	71
Figura 9. Conteúdo de Na ⁺ e K ⁺ em folhas de <i>V. unguiculata</i> crescidas em solução nutritiva e analisado em fotômetro de chama após 6, 12 e 24 horas de exposição ao NaCl 100 mM.	71
Figura 10. Expressão do gene <i>VuVHA-A</i> de folhas (A) e raízes (B) de <i>V. unguiculata</i> com 6, 12 e 24 horas de estresse salino (NaCl 100 mM) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da <i>VuVHA-A</i> obtidos por análise de densitometria.	73
Figura 11. Expressão do gene <i>VuVHA-E</i> de folhas (A) e raízes (B) de <i>V. unguiculata</i> com 6, 12 e 24 horas de estresse salino (NaCl 100 mM) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da <i>VuVHA-E</i> obtidos por análise de densitometria.	75
Figura 12. Expressão do gene <i>VuHVP</i> de folhas (A) e raízes (B) de <i>V. unguiculata</i> com 6, 12 e 24 horas de estresse salino (NaCl 100 mM) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da <i>VuHVP</i> obtidos por análise de densitometria.	76
Figura 13. Expressão do gene <i>VuNHX2</i> de folhas (A) e raízes (B) de <i>V. unguiculata</i> com 6, 12 e 24 horas de estresse salino (NaCl 100 mM) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da <i>VuNHX2</i> obtidos por análise de densitometria.	78
Figura 14. Expressão do gene <i>VuNHX6</i> de folhas (A) e raízes (B) de <i>V. unguiculata</i> com 6, 12 e 24 horas de estresse salino (NaCl 100 mM) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da <i>VuNHX6</i> obtidos por análise de densitometria.	79

Figura 15. Expressão do gene <i>VuVHA-A</i> de folhas (A) e raízes (B) de <i>V. unguiculata</i> com 6, 12 e 24 horas de estresse osmótico (PEG 200,67g/IL) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da <i>VuVHA-A</i> obtidos por análise de densitometria.	81
Figura 16. Expressão do gene <i>VuVHA-E</i> de folhas (A) e raízes (B) de <i>V. unguiculata</i> com 6, 12 e 24 horas de estresse osmótico (PEG 200,67g/IL) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da <i>VuVHA-E</i> obtidos por análise de densitometria.	82
Figura 17. Expressão do gene <i>VuHVP</i> de folhas (A) e raízes (B) de <i>V. unguiculata</i> com 6, 12 e 24 horas de estresse osmótico (PEG 200,67g/IL) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da <i>VuHVP</i> obtidos por análise de densitometria	84
Figura 18. Expressão do gene <i>VuNHX2</i> de folhas (A) e raízes (B) de <i>V. unguiculata</i> com 6, 12 e 24 horas de estresse osmótico (PEG 200,67g/IL) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da <i>VuNHX2</i> obtidos por análise de densitometria.	85
Figura 19. Expressão do gene <i>VuNHX6</i> de folhas (A) e raízes (B) de <i>V. unguiculata</i> com 6, 12 e 24 horas de estresse osmótico (PEG 200,67g/IL) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da <i>VuNHX6</i> obtidos por análise de densitometria.	87
Figura 20. Sequência parcial da subunidade A da ATPase de <i>V. unguiculata</i>	88
Figura 21. Sequência parcial da PPase de <i>V. unguiculata</i>	90
Figura 22. Mini-preparação do plasmídeo pGEM-Teasy dos contra-transportadores vacuolares <i>NHX2</i> , <i>3</i> e <i>6</i> .	91
Figura 23. Comparação das sequências de aminoácidos entre contra-transportadores vacuolares de <i>V. unguiculata</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Vitis vinifera</i> e <i>Populus trichocarpa</i> . As regiões de consenso estão marcadas em azul. A numeração corresponde à contagem dos resíduos de aminoácidos.	92
Figura 24. Árvore filogenética dos genes do contra-transportador vacuolar (NHX) de plantas de <i>V. unguiculata</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Vitis vinifera</i> e <i>Populus trichocarpa</i> .	94

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Feijão de corda	20
2.2 Conceito de estresse	22
2.3 Estresse salino e osmótico	24
2.4 Adaptação das plantas ao estresse salino e osmótico	27
2.5 Vacúolo	33
2.6 Tonoplasto	36
2.7. V-H ⁺ -ATPase	39
2.7.1 Estrutura e composição das H ⁺ -ATPases vacuolares	40
2.7.2 Regulação da V-ATPase	43
2.8 V-PPase	45
2.8.1 Caracterização inicial	46
2.8.2 Atividade e distribuição	48
2.8.3 PPI como fonte de energia	49
2.8.4 Regulação da V-PPase	50
2.9 Contra-transportador vacuolar (NHX)	51
2.9.1 Regulação do NHX	53
3. OBJETIVOS	55
3.1 Objetivo geral	55
3.1 Objetivos específicos	55
4. MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 Material vegetal	56
4.2 Sistema de hidroponia	56
4.2.1 Solução nutritiva	56
4.2.2 Estresse salino e osmótico em plantas de <i>Vigna unguiculata</i>	57
4.3 Parâmetros de crescimento	57
4.4 Dosagem de íons Na ⁺ e K ⁺	57
4.5 Extração de RNA total de folhas e raízes de plântulas de <i>Vigna unguiculata</i>	58
4.6 Quantificação de RNA total	58
4.7 Eletroforese do RNA total	59
4.8 Escolha dos oligonucleotídeos para RT-PCR	59
4.9 RT-PCR	60
4.10 Eletroforese do cDNA amplificado da ATPase e da PPase	63
4.11 PCR em condições saturadas visando clonagem e purificação de genes	63
4.12 Purificação do produto de RT	64
4.13 Clonagem do fragmento amplificado	64

4.14 Preparação de bactérias JM 109 competentes	65
4.15 Seleção de colônias transformadas	65
4.16 Mini-preparação do plasmídeo	66
4.17 Digestão do plasmídeo pGEM-T Easy por enzimas de restrição	66
4.18 Sequenciamento e comparação de sequências	67
4.19 Análise de Bioinformática dos genes das bombas de prótons (<i>VuVHA-A</i> , <i>VuHVP</i>) e dos contra-transportadores vacuolares (<i>VuNHX1</i> , <i>VuNHX2</i> , <i>VuNHX3</i> e <i>VuNHX4</i>).	67
4.19.1 BLAST	67
4.19.2 ClustalW2	68
4.19.3 Relações Filogenéticas	68
5. RESULTADOS	69
5.1 Parâmetros de crescimento	69
5.2 . Conteúdo de Na ⁺ e K ⁺ em plântulas de <i>Vigna unguiculata</i>	70
5.3. Análise da expressão de mRNA das bombas de H ⁺ vacuolares (V-ATPase e da V-PPase) e dos contra-transportadores vacuolares de prótons (NHX) de plântulas submetidas a estresse salino (NaCl 100 mM) e estresse osmótico (PEG 200,67 g/L)	72
5.3.1. Avaliação da expressão da subunidade A da V-ATPase (<i>VuVHA-A</i>) em folhas e raízes submetidas a estresse salino	72
5.3.2. Avaliação da expressão da subunidade E da V-ATPase (<i>VuVHA-E</i>) em folhas e raízes submetidas a estresse salino	74
5.3.3. Avaliação da expressão da V-PPase (<i>HVP</i>) em folhas e raízes submetidas a estresse salino	74
5.3.4. Avaliação da expressão do <i>VuNHX2</i> em em folhas e raízes submetidas a estresse salino	77
5.3.5. Avaliação da expressão do <i>VuNHX6</i> em plântulas submetidas a estresse salino (NaCl 100 mM)	77
5.3.6. Avaliação da expressão da subunidade A da V-ATPase (<i>VuVHA-A</i>) em folhas e raízes submetidas a estresse osmótico	80
5.3.7. Avaliação da expressão da subunidade E da V-ATPase (<i>VuVHA-E</i>) em folhas e raízes submetidas a estresse osmótico	80
5.3.8. Avaliação da expressão da V-PPase (<i>VuHVP</i>) em folhas e raízes submetidas a estresse osmótico	83
5.3.9. Avaliação da expressão do contra-transportador vacuolar (<i>VuNHX2</i>) em folhas e raízes submetidas a estresse osmótico	83
5.3.10. Avaliação da expressão do contra-transportador vacuolar (<i>VuNHX6</i>) em folhas e raízes submetidas a estresse osmótico	86
5.4 Sequenciamento dos clones de cDNA da ATPase vacuolar de <i>Vigna unguiculata</i>	87
5.5 Sequenciamento do gene da PPase vacuolar de <i>Vigna unguiculata</i>	89
5.6 Sequenciamento de clones de cDNA do contra-transportador vacuolar (NHX)	91
5.7. Alinhamento de sequências de genes <i>NHX</i> e construção de árvore	91

filogenética	
6. DISCUSSÃO	95
7. CONCLUSÃO	105
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

1. INTRODUÇÃO

O Ceará se mantém como o maior produtor brasileiro de feijão de corda, sendo responsável por 20% da produção total do País. A cultura do feijão no Estado não é somente uma das principais atividades econômicas, como também representa a maior fonte de suprimento alimentar de muitas famílias (TEIXEIRA, 1988). É preocupante o fato da agricultura no Estado estar apresentando um declínio gradual em termos de importância relativa para a sua economia. Declínio este que pode estar associado a estresses ambientais, relacionados com temperaturas elevadas, seca e salinidade, condições conhecidas mundialmente por limitarem a produtividade das culturas.

O estresse salino está entre os principais fatores limitantes da produtividade de diferentes culturas agrônômicas, afetando quase um bilhão de hectares de solos agrários, isto representa cerca de 7% de toda a área terrestre (MUNSS, 2002). Vale salientar que o problema da salinização está aumentando, principalmente devido às más práticas de agricultura, e que as terras afetadas por sais apresentam baixas produtividades agrícolas ou, mesmo, encontram-se fora do sistema produtivo. Uma das conseqüências do aumento da salinidade no solo é induzir nas plantas um estresse osmótico devido à diminuição da atividade química da água, causando perda do turgor celular. Pode-se ainda associar à salinidade um problema específico de toxicidade iônica e inibição do crescimento de plantas.

Os mecanismos de tolerância ao sal em células vegetais têm sido amplamente descritos nas perspectivas ecológica, fisiológica e através de aspectos biológicos celulares e moleculares. Faz-se necessária a compreensão da fisiologia da adaptação de plantas de feijão ao estresse salino e osmótico para a formulação de novas estratégias que possam vir a melhorar o desempenho e a produção da cultura do feijão na nossa região.

Tendo em vista que o controle do transporte de íons através da membrana plasmática e do tonoplasto é o fator chave na tolerância ao sal pelas células vegetais, essa regulação do fluxo de íons é necessária para que as células mantenham baixas concentrações de íons tóxicos e acumulem íons essenciais (ZHU, 2003). O estudo das da expressão dos genes das

bombas de prótons (V-ATPase e V-PPase) e dos contra-transportadores vacuolares (NHX) de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 bem como a avaliação do conteúdo de íons Na^+ e K^+ das plantas submetidas a estresse salino e osmótico, torna-se fundamental para que se possa compreender a fisiologia da adaptação a esses estresses. O conhecimento molecular dessas proteínas também é alvo de interesse para que no futuro plantas geneticamente modificadas, mais tolerantes ao estresse salino e osmótico, possam ser obtidas. Vale ressaltar que a aquisição de conhecimentos nessa área poderá viabilizar o desenvolvimento de plantas modificadas em regiões afetadas pela salinidade, favorecendo o aumento da produção dessa cultura na nossa região.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FEIJÃO DE CORDA

Feijão é um nome comum para uma grande variedade de sementes de plantas de alguns gêneros da família Fabaceae (anteriormente, Leguminosae). O seu cultivo é bastante antigo. Há referências a ele na Grécia antiga e no Império romano, onde feijões eram utilizados para votar (um feijão branco significava *sim*, e um feijão preto significava *não*). Três espécies de feijão são muito cultivadas no Brasil:

- *Phaseolus vulgaris*, o feijão comum, cultivado em todo o território;
- *Vigna unguiculata*, vulgarmente chamado de feijão de corda, feijão macassar, caupi e outros, predominante na região Nordeste e na Amazônia e
- *Cajanus cajan*, feijão-guandu ou andu, comum no nordeste, principalmente em sua variedade arbórea.

A espécie *Vigna unguiculata*, vulgarmente conhecida como feijão de corda, feijão fradinho, feijão macassar, feijão de praia e caupi, trata-se de uma dicotiledônea que pertence à ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, sub-família *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, sub-tribo *Phaseolinae*, gênero *Vigna* (VERDCOURT, 1970). A família *Fabaceae* consiste de 757 gêneros e mais de 20 000 espécies (LEWIS et al., 2005 apud TIMKO et al., 2008). A diversificação começou logo após a primeira leguminosa identificada que apareceu no registro fóssil a mais de 56 milhões de anos atrás, e todos os legumes encontrados são descendentes de um ancestral comum de aproximadamente 59 milhões de anos (TIMKO et al., 2008).

A família é dividida dentro de vários clados com a maioria das espécies modelo concentradas no clado Papilionoideae clado “Halogalegina” (adaptadas a temperaturas climáticas como *Lotus* e *Medicago*) e “phaseoloid/millettioids” (espécies de estação quente como glicina e *Phaseolus*). O caupi pertence a outro clado, juntamente com outras importantes culturas de estação quente como *P. vulgaris*, *Cajanus cajan* e soja (TIMKO et al., 2008). O gênero *Vigna* é anteriormente denominado Leguminosae, é composto de mais de

200 espécies que são nativas de regiões quentes em todos os continentes. A grande maioria dessas espécies está na África, onde 66 delas são consideradas endêmicas, sugerindo que o gênero *Vigna* deve ter sua evolução ligada a esse continente. Esse gênero possui várias espécies que são consideradas importantes economicamente em muitos países em desenvolvimento e entre as espécies que ocorrem na África está a *Vigna unguiculata* (L.) Walp. A área mundialmente ocupada com o feijão caupi, é de aproximadamente 12,5 milhões de hectares, estando 64% localizada na parte oeste e central da África. O restante está localizado na América do Sul, América Central e Ásia, com pequenas áreas espalhadas pelo sudoeste da Europa, dos Estados Unidos e da Oceania. Os principais produtores são Nigéria, Níger e Brasil (FERY, 2002).

No Brasil, o feijão caupi é cultivado predominantemente no sertão semi-árido da região Nordeste e em pequenas regiões da Amazônia. Apresenta-se como produtor e como o maior consumidor, sendo o Ceará o maior produtor nacional, com estimativa em cerca de 20% da produção brasileira, representando 95% da produção estadual de outros feijões (IBGE, 2003). Além disso, como é cultivado por pequenos agricultores, para estas famílias, em muitos casos, a cultura representa, não apenas a principal fonte de suprimento alimentar, mas também a principal atividade econômica.

O feijão de corda é considerado de grande importância para o sustento de populações relativamente pobres em países tropicais menos desenvolvidos, por ser dotado de alto conteúdo protéico e pouco exigente em fertilidade do solo (ARAÚJO E WATT, 1988). Além do grão, suas folhas e vagens imaturas são usadas como alimento sendo bastante nutritivos, fornecendo proteínas, vitaminas e minerais. O grão contém em média 23-25% de proteína e 50-67% de amido. O feijão de corda é essencial no apoio à produção animal e a de cereais em regiões semi-áridas, servindo como forragem, esteio, protegendo o solo contra a erosão e também na eliminação de certas plantas parasitas. Outra importante característica desse feijão é a de promover a fixação do nitrogênio através da simbiose com a bactéria de nódulo (*Bradyrhizobium ssp.*). Já foi visto que, o plantio de feijão de corda, além de manter a reserva de nitrogênio do solo, também é capaz de aumentá-la (SINGH et al., 1997).

Apesar de o feijão ser uma cultura predominante de regiões semi-áridas, a deficiência de água é um dos fatores mais limitantes para a obtenção de boa produtividade de feijão caupi. Com o uso da irrigação é possível suprir a quantidade de água para o adequado crescimento e desenvolvimento dessa leguminosa. Entretanto, para o sucesso técnico e econômico dessa atividade, é necessário que se identifique quando, quanto, e como irrigar, pois o uso inadequado da irrigação pode trazer sérias conseqüências como a salinização dos solos (ANDRADE JUNIOR et al., 2004).

Nesse contexto, tem sido estudado diferentes cultivares de feijão de corda que apresenta diferentes graus de tolerância a salinidade e ou à seca, por exemplo, sendo Vita 3 considerado como tolerante e Vita 5, designado como cultivar sensível (FERNANDES DE MELO et al., 1994).

2.2. CONCEITO DE ESTRESSE

Em condições ambientais e agricultáveis, as plantas estão frequentemente expostas a estresse ambiental (Figura 1). Alguns fatores dessa natureza, como a temperatura do ar, por exemplo, podem se tornar estressantes em poucos minutos; enquanto outros como o conteúdo de água no solo, podem levar dias ou até semanas e, ainda, fatores tais como as deficiências minerais no solo necessitam de meses para se manifestar. Estresse é em geral definido como um fator externo, que exerce influência desvantajosa sobre a planta. O conceito de estresse está intimamente relacionado à tolerância ao estresse, que é a aptidão da planta para enfrentar um ambiente desfavorável (TAIZ; ZEIGER; 2004). Se a tolerância aumenta como conseqüência de exposição anterior ao estresse, diz-se que a planta está aclimatada. A aclimatação pode ser distinguida da adaptação, que em geral se refere a um nível de resistência geneticamente determinado, adquirido por um processo de seleção durante muitas gerações (TAIZ; ZEIGER; 2004).

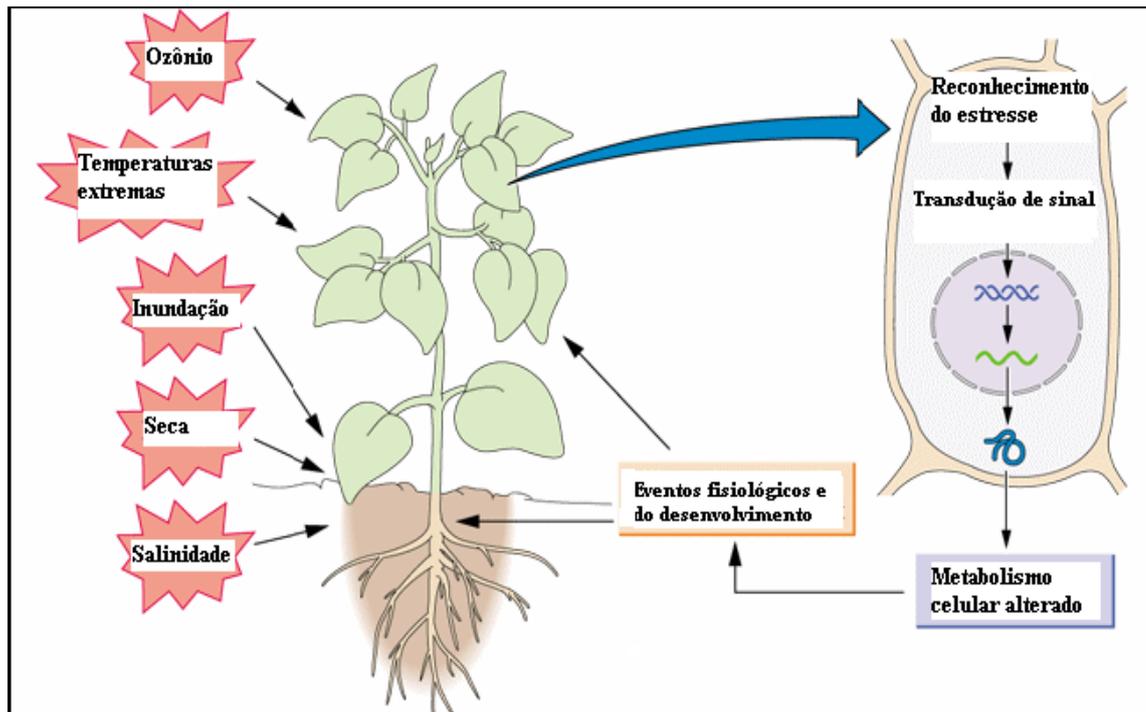


Figura 1. As respostas das plantas aos estresses podem ser tanto em nível celular como no organismo de maneira geral. Estresses constituem sinais ambientais que são recebidos e reconhecidos pelas plantas. Depois do reconhecimento do estresse, o sinal é passado da célula para todo o organismo. A transdução do sinal ambiental tipicamente resulta em alteração da expressão gênica em nível celular, o que pode influenciar o metabolismo e o desenvolvimento de todo o organismo (Buchanan, 2000).

A adaptação e a aclimação ao estresse ambiental resultam de eventos integrados que ocorrem em todos os níveis de organização, desde o anatômico e morfológico até o celular, bioquímico e molecular. As respostas da célula ao estresse incluem mudanças no ciclo e divisão celulares, mudanças no sistema de endomembranas e vacuolização, bem como alterações na arquitetura da parede celular. Tudo isso contribui para acentuar a tolerância das células ao estresse. Bioquimicamente, as plantas alteram o metabolismo de várias maneiras incluindo a produção de compostos osmorreguladores, tais como prolina e glicina betaína. Os eventos moleculares, ligando a percepção de um sinal de estresse às respostas genômicas que levam à tolerância, têm sido investigados nos últimos anos (TAIZ; ZEIGER; 2004).

2.3 ESTRESSE SALINO E OSMÓTICO

A salinidade e a seca são os maiores limitadores da produção e segurança alimentar, promovendo impactos sócio-econômico em muitos países desenvolvidos (BRINI et al., 2007). A razão para isso é que a maioria das espécies cultivadas são glicófitas, que são usualmente sensíveis ao sal. Altas concentrações de sal no citoplasma são deletérias para o crescimento das plantas sendo as folhas mais susceptíveis a toxicidade do Na^+ do que as raízes (CHEN, et al., 2009). Os prejuízos causados pela salinidade elevada dos solos têm sido atribuídos aos efeitos tóxicos de Na^+ sobre a nutrição e o metabolismo das plantas, especialmente sobre a absorção, a distribuição e a utilização do K^+ (ASPE; BLUMWALD, 2007). A salinização dos solos cultivados tem aumentado principalmente nas áreas irrigadas, causando a redução da produtividade de várias culturas (MUNNS; TESTER; 2008). A salinidade afeta 7% da área de plantio mundial, uma quantidade de aproximadamente 930 milhões de hectares (SZABOLCS, 1994; MUNNS, 2002; FLOWERS, 2004). Os sistemas de irrigação envolvem somente 15% da área cultivada no mundo, no entanto, a produtividade das áreas submetidas a esses sistemas é duas vezes maior que a das áreas irrigadas pelas chuvas e assim contribui com o suprimento de 1/3 da alimentação mundial (MUNSS, 2002; MUNNS; TESTER; 2008). A água utilizada para a irrigação dos solos contém elevada concentração de cálcio, de magnésio e menor concentração de Na^+ . Com a evaporação da água, o cálcio e o magnésio são induzidos a precipitarem no solo na forma de carbonatos e o Na^+ torna-se o cátion predominante no solo (ASHRAF, 2000). Tem sido determinado que o efeito da salinidade ocorra como resultado do estresse osmótico, interrupção das atividades metabólicas por excesso de íons e desbalanço e interferência de sais de íons pela captura de macro e micronutrientes essenciais (TESTER; DAVENPORT, 2003 apud PARK et al., 2009).

Os sais podem afetar o desenvolvimento das plantas, mas nem todos inibem o crescimento das mesmas. A inibição do crescimento é um efeito da salinidade decorrente da presença dos íons Na^+ e Cl^- (TESTER; DAVENPORT, 2003).

A água é requerida como um meio para as atividades bioquímicas em todas as formas de vida conhecida. Nas plantas, a pressão de turgor gerada pela água é também uma força que

direciona a expansão celular. Entretanto, o crescimento vegetativo das plantas pode ocorrer somente a certos intervalos de estado hídrico, que pode ser medido pelo estado de energia livre das moléculas de água – potencial hídrico. Com a manutenção de uma pressão de turgor positiva as células de plantas normalmente ajustam o potencial osmótico para suprir seus requerimentos no balanço hídrico total. Mudança significativa no potencial osmótico do ambiente pode impor a planta estresse osmótico, com rompimento da atividade celular normal ou eventualmente causar a morte da planta. Em condições naturais, o aumento da salinidade e da seca são as principais causas do estresse osmótico das plantas (XIONG; ZHU, 2002).

Quando a água de irrigação contém alta concentração de solutos, ou quando o lixiviamento é limitado, a concentração salina do solo atinge um teor que causa danos às espécies sensíveis ao sal (FLOWERS et al., 1977). Escassez de água, declínio da qualidade de água para a irrigação e salinidade dos solos são problemas os quais se tornam mais agudos (FLOWERS 2004 apud BRINI 2007).

A salinidade induz estresse osmótico que é um declínio da entrada de água resultante do aumento da pressão osmótica externa e um estresse salino, caracterizado por distúrbios fisiológicos na planta causada por desequilíbrio iônico no citoplasma das células vegetais (GREEWAY; MUNNS, 1980; FLOWERS et al., 1977). O estresse osmótico não só tem um efeito imediato no crescimento, mas também tem um efeito maior nas taxas de crescimento do que o estresse iônico. O impacto do estresse iônico no crescimento ocorre depois e com menor efeito do que com o estresse osmótico. Somente em elevados níveis de salinidade, ou em espécies sensíveis que não tem habilidade para controlar o transporte de Na^+ , o efeito iônico é preponderante sobre o efeito osmótico (MUNNS; TESTER; 2008). As células vegetais podem ajustar-se ao estresse osmótico através da pressão osmótica interna, um processo que é facilitado pelo acúmulo de solutos no vacúolo. O ajuste osmótico é também uma resposta fundamental da célula ao estresse salino. Acredita-se que os sais responsáveis pela manutenção da osmolaridade na célula são seqüestrados para o vacúolo e o balanço da pressão osmótica do citoplasma com a do vacúolo é compensado pelo acúmulo de solutos orgânicos, como betaína e prolina no citoplasma (LONE et al., 1987; BINZEL et al., 1987).

Contudo, a síntese desses solutos compatíveis não tóxicos, é energeticamente dispendiosa para a célula e outro agravante do estresse osmótico é também a indução do estresse oxidativo (TESTER; DAVENPORT, 2003). Existem proteínas consideradas tolerantes ao estresse osmótico, como as que protegem a integridade de membranas, controlam a homeostase iônica e hídrica e o sequestro de espécies reativas de oxigênio (HASEGAWA et al., 2000). A desorganização da membrana, a formação de espécies reativas de oxigênio, a toxicidade metabólica, a inibição da fotossíntese e a atenuada aquisição de nutrientes são consequências do estresse salino e/ou osmótico que comprometem o crescimento e o desenvolvimento das plantas podendo levar à morte (HASEGAWA et al., 2000).

Altas concentrações salinas inibem a maioria das enzimas por causar perturbação do balanço hidrófobo-eletrostático entre as forças que mantêm a estrutura das proteínas (WYN JONES; POLLARD, 1983; QUEIRÓS et al., 2009). Íons Cl^- por sua vez, podem interferir nos sítios aniônicos envolvidos na ligação entre mRNA e metabólicos aniônicos tais como bicarbonato, carboxilatos e açúcares fosfato (WYN JONES; POLLARD, 1983; SERRANO, 1996). Alguns efeitos da grande quantidade de Na^+ no solo são ainda resultado da deficiência de outros nutrientes (SILBERBUSH; BEM-ASHER, 2001; TESTER; DAVENPONTE, 2003; OLIVEIRA, 2007), ou de interações com outros fatores ambientais tais como seca, que potencializa os problemas da toxicidade do Na^+ . Outro problema da toxicidade do Na^+ é causada principalmente pela similaridade nas propriedades físicoquímicas entre os íons Na^+ e K^+ pelo padrão de competição pelo melhor sítio de ligação para um processo metabólico chave no citoplasma, como reações enzimáticas, síntese de proteínas e funções do ribossomo levando a perda da homeostase celular (SHABALA; CUIN; 2007).

Os transportadores de íons bem como sua regulação desempenham papéis fisiológicos cruciais como a manutenção da concentração intracelular ótima de íons. Em geral, com exceção de archaeobactérias halófitas, essa faixa consiste de concentrações relativamente altas de K^+ e concentrações relativamente baixas de Na^+ , de prótons e de cálcio. Um pH neutro pode ser necessário para a estabilidade de proteínas, além disso, uma relação alta de magnésio/cálcio favorece a solubilidade de compostos fosfatados.

Os prejuízos causados especificamente pelo Na^+ estão associados à acumulação desse íon nas folhas levando a necrose das folhas mais velhas, a partir das extremidades e margens alcançando posteriormente toda a sua extensão (MUNNS, 2002). A redução do crescimento e da safra ocorre como resultado do menor tempo de vida de folhas individuais, reduzindo assim a produtividade de culturas. Assim, o aumento da tolerância ao sal de plantas cultivadas através da manipulação genética ou tecnologia transgênica para transferir um gene de tolerância ao sal é uma estratégia realística (HASEGAWA et al., 2000, FLOWERS et al., 2004 apud BRINI 2007).

2.4 ADAPTAÇÕES DAS PLANTAS AO ESTRESSE SALINO E OSMÓTICO

O estresse salino e a desidratação mostram um grau de similaridade com respeito aos efeitos fisiológicos, bioquímicos, moleculares e genéticos (SAIRAM; TYAGI; 2004). As plantas diferem na tolerância a salinidade, como refletido nas diferentes respostas de crescimento. A variação de tolerância a salinidade em espécies dicotiledôneas é igualmente numeroso como em monocotiledôneas. Algumas espécies são muito sensíveis, outras moderadamente sensíveis e outras muito tolerantes e existe as halófitas que continuam um bom crescimento no ambiente salino. Para entender os mecanismos fisiológicos de tolerância a salinidade dessas espécies, é necessário conhecer se o crescimento delas é limitado na natureza pelo efeito osmótico do sal no solo, ou o efeito tóxico do sal dentro da planta. A resposta ao estresse salino nas plantas ocorre em duas fases: uma rápida resposta de aumento da pressão osmótica externa, e uma lenta resposta obrigando uma acumulação de Na^+ nas folhas (MUNNS; TESTER; 2008).

As plantas submetidas a estresses ambientais (lesões, baixas temperaturas, seca, salinidade, etc) sofrem uma série de alterações metabólicas com vistas à manutenção da homeostase celular. O mecanismo de tolerância ao estresse salino e/ou osmótico em várias espécies de plantas reside a nível celular. O seqüestro e a exclusão de íons, o ajustamento osmótico, a homeostase dos lipídios de membrana e os sistemas de transportadores de membrana em ambientes salinos são importantes estratégias celulares que conferem a planta tolerância ao sal (MANSOUR, 2003).

Estudos intensivos sobre o mecanismo de resistência ao sal em plantas têm sido conduzidos a nível celular e a importância do controle do transporte de íons através da membrana plasmática e do tonoplasto em plantas adaptadas ao sal tem sido demonstrada (NAKAMURA et al, 1992).

Pesquisas têm mostrado que plantas halófitas e glicófitas tolerantes à salinidade utilizam preferencialmente estratégias similares e processos análogos (HASEGAWA, et al., 2000). Íons citotóxicos em ambientes salinos, tipicamente Na^+ e Cl^- são compartimentalizados no interior do vacúolo e usados como solutos osmóticos (BLUMWALD et al., 2000; NIU et al., 1995).

Em nível celular, a restrição da entrada de Na^+ através da exclusão de Na^+ de volta para a solução do solo (via SOS1 ou contra-transportador Na^+/H^+ da membrana plasmática (ZHU, 2003) ou para dentro do vacúolo (via NHX ou contra-transportador Na^+/H^+ do vacúolo (ZHANG; BLUMWALD; 2001)), são considerados eventos centrais para a tolerância ao sal (SHABALA; CUIN; 2007). Existe também evidência que a habilidade da célula em reparar danos, remover espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteger as estruturas sensíveis da célula através do aumento da síntese de uma extensa variedade de proteínas que agem como chaperonas, pode ser pelo menos tão importante quanto os transportadores supracitados. A adaptação das plantas como um todo a salinidade pode ser atingida por vários mecanismos como a redução do acúmulo de Na^+ na parte aérea, recirculação de Na^+ no floema, compartimentalização em tecidos e órgãos específicos (como um acúmulo preferencial de Na^+ em órgãos fisiologicamente pouco importantes, ex: folha senescente, bainha foliar ou epiderme), e, em algumas espécies, pela secreção de Na^+ das folhas por estruturas especializadas como glândulas ou vesículas de sal (TESTER; DAVENPORTE; 2003 apud SHABALA; CUIN; 2007). Outro importante mecanismo é a recirculação do Na^+ dos órgãos fotossintéticos de volta para as raízes. Existem sugestões de que esse processo é mediado por transportadores de K^+ de alta afinidade (HKT). Pelo fato esses transportadores estarem envolvidos na entrada de K^+ nos tecidos das plantas, não é surpresa que esses transportadores HKT tem recentemente tornado-se a melhor estratégia no melhoramento de plantas para tolerância ao sal (BYRT et al., 2007; SHABALA; CUIN; 2007).

Tem sido observado que a expansão celular como as adaptações citomorfológicas à presença de NaCl facilita o acúmulo de íons para o ajuste osmótico (BINZEL et al., 1987). Isso inclui taxas reduzidas de expansão celular e do volume celular final que diminuiria o fluxo total de íons através do citosol e também diminuiria o conteúdo absoluto de íons por célula. O aumento da relação volume do citoplasma/volume do vacúolo iria depois reduzir a quantidade de íons acumulada, necessária por célula, para estabelecer o ajuste osmótico. Quanto maior a superfície membranar por volume celular, especialmente a superfície do tonoplasto, maior é capacidade das células de manter grandes “pools” de íons durante o crescimento. Essas condições na geometria celular não iriam por si mesmas favorecer a relação saída/entrada de íons, mas iriam diminuir o tempo necessário para encher e esvaziar um compartimento (baseado na direção do fluxo do líquido). Porém, é provável que a tolerância ao sal envolva adaptações na membrana que afetem a permeabilidade e facilitem o transporte de íons (REUVENI et al., 1990).

Com a toxicidade do Na^+ ocorrendo como resultado da competição com o K^+ para ativação de enzimas e a biossíntese de proteínas a habilidade da planta para sobreviver em ambientes salinos, não está diretamente ligada a quantidade absoluta de Na^+ , mas sim a taxa de K^+/Na^+ citosólico. Além do mais, a taxa de K^+/Na^+ tem sido repetidamente citada como o principal determinante para a tolerância ao sal pelas plantas (SHABALA; CUIN; 2007; CUIN et al., 2003; DEVOŘÁK et al., 2004; GAXIOLA et al., 1999). Uma taxa K^+/Na^+ citosólica ótima pode ser mantida pela restrição da acumulação de Na^+ em tecidos de plantas ou prevenindo a perda de K^+ das células (SHABALA; CUIN; 2007).

Como mencionado antes, o ajustamento osmótico é um atributo essencial para tolerância das plantas ao sal. Em condições de salinidade, Na^+ e Cl^- são osmótilos baratos que podem ser usados para a manutenção do turgor celular normal, assumindo que estão eficientemente compartimentalizados no vacúolo das células. Contudo, com um aumento do nível de sal no vacúolo, gera um gradiente de potencial osmótico substancial entre o vacúolo e o citosol, reduzindo a atividade da água neste último (SHABALA; CUIN; 2007).

O controle do transporte de íons através da membrana plasmática e do tonoplasto é fator chave na tolerância ao sal pelas células vegetais. Para prevenir o lento crescimento ou morte celular o excesso de Na^+ deve ser excretado ou compartimentalizado no vacúolo. Como as células vegetais não possuem Na^+ -ATPases ou Na^+/K^+ -ATPases, elas precisam das H^+ -ATPase e da H^+ -PPase para promover a força proton-motriz que dirige o transporte de outros íons e metabólitos. Muitos dos transportadores de H^+ , K^+ e Na^+ não foram bem identificados. A regulação dos mecanismos que controlam a expressão e atividade desses transportadores não está ainda elucidada (ZHU, 2003).

A capacidade de manter uma relação relativamente alta de K^+/Na^+ no citoplasma e a de seqüestrar NaCl para fora dos sítios do metabolismo celular, são dois dos mais críticos requerimentos para que haja crescimento da planta em condições salinas. O crescimento das células vegetais ocorre primariamente pela expansão direcional mediada pelo aumento do volume celular, compartimentalização de Na^+ e Cl^- facilitando o ajustamento osmótico que é essencial para o desenvolvimento celular. Essa compartimentalização pode ser realizada com mínima ou nenhuma exposição do citosol aos íons tóxicos (HASEGAWA, et al., 2000). Presumivelmente, a regulação coordenada do sistema de transporte de íons é requerida para controlar a entrada na membrana plasmática e compartimentalização vacuolar (WYN JONES, 1981).

Em uma exposição a estresse osmótico, as plantas exibem um amplo espectro de respostas, molecular, celular e em toda a planta. Isso inclui, por exemplo, mudanças morfológicas e de desenvolvimento (ciclo de vida, inibição do crescimento do caule e melhoramento no crescimento das raízes), ajustamento no transporte de íons (seqüestro e exclusão de íons) e mudanças metabólicas (metabolismo do carbono, síntese de solutos compatíveis). Algumas dessas respostas são geradas como sinais de estresse osmótico primário enquanto outras podem resultar em sinais de estresse secundário causados pelos sinais primários. Esse sinal secundário pode ser um fitormônio (ácido abscísico, etileno), espécies reativas de oxigênio e mensageiros secundários intracelulares (XIONG; ZHU, 2002).

Em condição de estresse osmótico, uma importante consideração é para a acumulação

de compostos osmoticamente ativos no intuito de diminuir o potencial osmótico. Esses são referidos como osmólitos compatíveis por que aparentemente não interferem com o metabolismo normal das células. Moléculas semelhantes de glicerol e açúcar foram descobertas como métodos empíricos para proteger macromoléculas biológicas contra os efeitos danosos da salinidade (SAIRAM; TYAGI; 2004). Um estudo sistemático dessas moléculas, as quais se acumulam em halófitas e em organismos halo-tolerantes, permitiu a identificação de uma variedade de substâncias com habilidade de promover proteção. Caracteristicamente, essas moléculas não sofrem grandes mudanças, mas são polares, altamente solúveis e tem uma grande cápsula de hidratação. Deste modo, as moléculas podem ser preferencialmente solubilizadas no “pool” de água da célula onde elas podem interagir diretamente com as macromoléculas (SAIRAM; TYAGI; 2004).

Muitos metabólicos e processos fisiológicos podem ser inibidos por altas concentrações de Na^+ acumulado no citoplasma e possivelmente também no núcleo, incluindo atividade de enzimas e fatores de transcrição. A tolerância de algumas glicófitas a solos salinos pode ser creditado à exclusão de Na^+ para fora das células, ou ao seqüestro de Na^+ para dentro do vacúolo, e contra-transportadores Na^+/H^+ na membrana plasmática e no tonoplasto exercem função vital nesses processos (CHEN, et al., 2009). Em plantas, o contra-transportador Na^+/H^+ de membranas vacuolares transporta Na^+ do citoplasma para o vacúolo usando o gradiente eletroquímico de prótons gerado por duas bombas de prótons a V-PPase e a V-ATPase (FUKUDA et al., 2004), sugerindo que as duas bombas de prótons tem participação essencial na resposta das plantas as mudanças ambientais como o estresse salino (FUKUDA et al., 2006). A superexpressão do contra-transportador vacuolar Na^+/H^+ e da H^+ -PPase tem resultado no aumento da tolerância da planta a salinidade e a seca (APSE et al., 1999; ZHANG; BLUMWALD, 2001 apud BRINI et al, 2007).

A figura 2 mostra os mecanismos envolvidos na manutenção da homeostase celular estabelecida após adaptação das plantas ao estresse salino (NaCl) (HASEGAWA et al., 2000). O acúmulo de íons no vacúolo serve não somente para evitar o aumento da concentração iônica no citoplasma, mas ainda para aumentar a osmolaridade celular prevenindo o estresse osmótico (MIMURA et al., 2003).

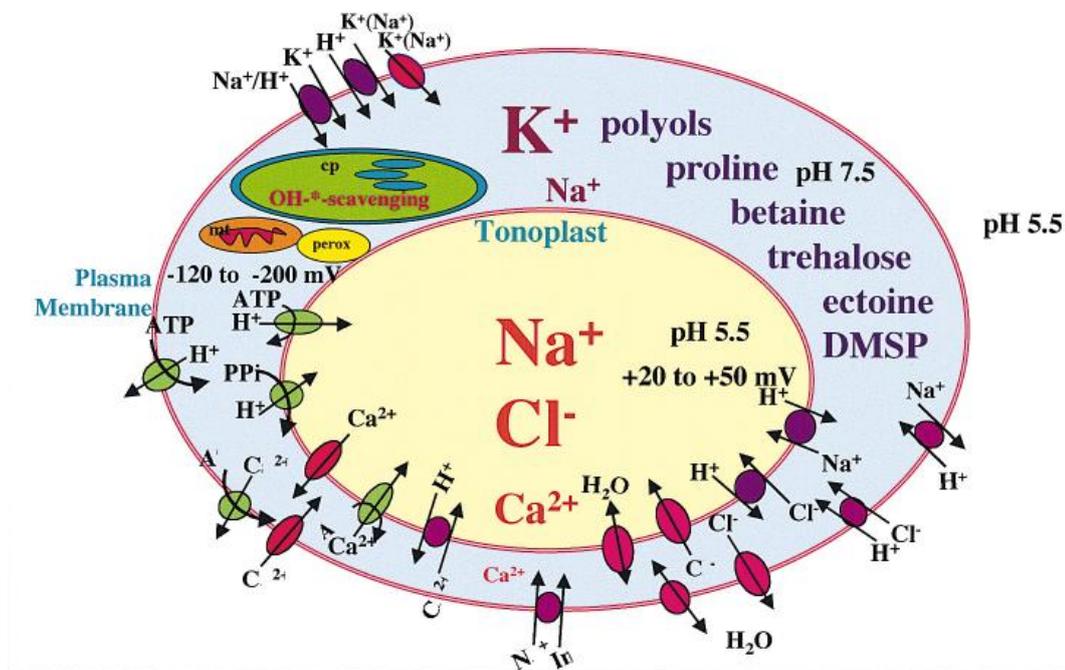


Figura 2. Homeostase celular estabelecida após adaptação de plantas ao estresse salino (NaCl). Estão indicados: compartimentação de osmólitos e íons no citoplasma e vacúolo; as proteínas transportadoras responsáveis pela homeostase do Na^+ e Cl^- ; canais de água; e o potencial eletroquímico através da membrana plasmática e do tonoplasto. As organelas que têm importância no sequestro de EROS estão indicadas como: cloroplasto (cp), mitocôndria (mt), e peroxissomos (perox) (Hasegawa et al., 2000).

Muitos esforços têm sido devotados nos últimos anos para identificar fatores que conferem resistência ao sal. Baseado na identificação de genes de sistemas SOS (ZHU, 2002 apud MARTINOIA et al., 2007) como o contra-transportador Na^+/H^+ de membrana plasmática (SOS1), de uma proteína quinase (SOS2) e de uma proteína ligante ao cálcio (SOS3), do contra-transportador Na^+/H^+ vacuolar que são fatores importantes implicados na tolerância ao NaCl (MARTINOIA et al., 2007). O primeiro o contra-transportador Na^+/H^+ vacuolar foi identificado em *Saccharomyces cerevisiae*. Em *Arabidopsis thaliana* o primeiro contra-transportador Na^+/H^+ identificado foi *AtNHX1* membro de uma família de seis genes (*AtNHX1- AtNHX16*) que mostra sequência homóloga para mamíferos e levedura *NHE* ou *NHX* trocador (ASPE et al., 1999, GAXIOLA et al., 1999, YOKOI et al., 2002). Em muitas espécies de plantas, genes *NHX* estão envolvidos na tolerância a salinidade, na acumulação de íon no vacúolo e na regulação do pH (FUKUDA-TANAKA et al., 2000, YAMAGUCHI et al.,

2001 apud ZHRAN et al., 2007) e são induzidos por NaCl, KCl, estresse osmótico, choque de temperatura (CHAUHAN et al., 2000, VENEMA et al., 2003, apud ZHRAN et al., 2007).

2.5 VACÚOLO

O vacúolo é uma organela presente em células de animais (esponjas), fungos (leveduras), protozoários, algas e plantas. Em plantas, essa organela é diversificada no tocante à forma, tamanho, conteúdo e dinâmica funcional (MARTY, 1999). É um compartimento celular delimitado por uma membrana simples designada tonoplasto e preenchido por um fluido aquoso. Nas células vegetais mais jovens são pequenos e numerosos, fundindo-se e aumentando de volume à medida que a célula vai amadurecendo. Numa célula vegetal madura o vacúolo pode ocupar cerca de 90% do volume celular (Figura 3). O conteúdo vacuolar é composto essencialmente por água e esta pode entrar e sair dos vacúolos em função da concentração do meio extracelular.

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

ARMAZENAMENTO DE SUBSTÂNCIAS

Os vacúolos funcionam como locais de armazenamento de várias substâncias. Grandes quantidades de ácidos orgânicos como ácido málico, ácido cítrico e ácido oxálico são armazenados. Proteínas são ativamente sintetizadas e armazenadas no vacúolo das células das sementes em amadurecimento formando os corpos protéicos. O vacúolo é a localização breve e/ou prolongada de nutrientes para a própria célula e para novos órgãos em crescimento (MAESHIMA et al., 1996). A maioria dos sabores das frutas e verduras é devida às substâncias armazenadas no vacúolo. Quando necessário esses metabólitos

primários podem ser solicitados do vacúolo e utilizados em vias metabólicas (TAIZ, 1992). O vacúolo é um clássico armazenador de compostos secundários e xenobióticos modificados nas plantas. Em cevada, glucosídeos flavonóides produzidos endogenamente e são transportados por mecanismos ligados ao contra-transporte de prótons, enquanto herbicidas fazem uso de transportadores do tipo ABC (MARTINOIA et al., 2007).

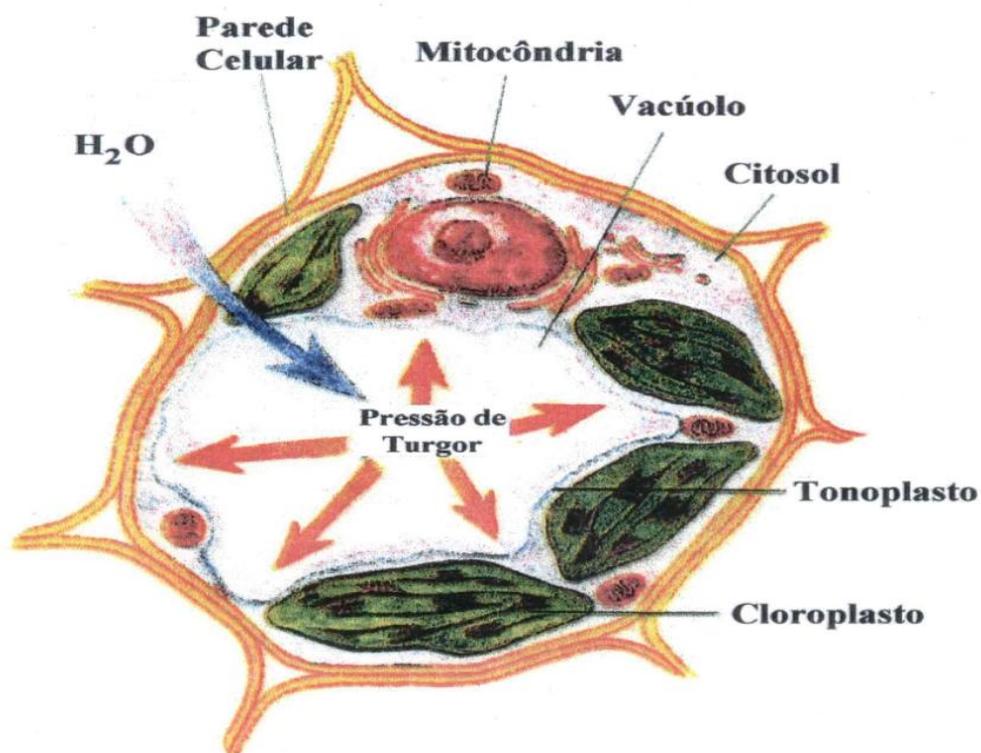


Figura 3. Célula vegetal mostrando um grande vacúolo central (Leningher, 2000).

pH e HOMEOSTASE IÔNICA

As reações que ocorrem no citosol são particularmente sensíveis a mudanças no pH e na força iônica. O pH do vacúolo de plantas superiores é mais ácido que o do citoplasma, cerca de duas unidades. Em princípio, as bombas de prótons localizadas no tonoplasto são capazes de regular o pH citosólico bombeando prótons do citosol para o interior do vacúolo (TAIZ, 1992).

DEFESA CONTRA PATÓGENOS MICROBIANOS E HERBÍVOROS

Entram nos vacúolos substâncias de sabor amargo como compostos fenólicos, glicosídeos, cianogênicos e alcalóides que são capazes de afastar os herbívoros (TAIZ, 1992). Outras substâncias como fitoalexinas chegam a inibir a proliferação de certos microrganismos. A quitinase, uma enzima que atua quebrando a parede celular de fungos, é especificamente sintetizada em resposta a uma injúria na planta e então acumulada no vacúolo do feijoeiro (BOLLER; VOGELI, 1984; BASSHAN, 2007; LIU; XIONG; BASSHAM, 2008).

PRESENÇA DE PIGMENTOS

Os vacúolos de tecido foliar concentram pigmentos como antocianinas, flavonóides solúveis em água responsáveis pelas colorações roxa e vermelho-alaranjada. Esses pigmentos previnem a foto-oxidação no aparelho fotossintético reduzindo a intensidade da luz e difundindo a radiação ultravioleta (TAIZ, 1992).

HIDRÓLISE E RECICLAGEM DE COMPONENTES CELULARES

Durante a germinação, as proteínas depositadas nos vacúolos armazenadores de proteínas (PSV) são hidrolisadas em aminoácidos pela ação de proteases. Assim, como os lisossomos de células animais, os vacúolos de plantas contêm várias hidrolases ácidas, como proteases, ribonucleases e glicosidades (BOLLER; WWIEMKEN, 1986).

Em fungos e plantas, durante os períodos de escassez de nutrientes, as organelas intracelulares e o citosol são sequestrados em autofagossomos que subseqüentemente se fundem com o vacúolo. A função principal desse fagossomo parece ser a de participar da quebra e da reciclagem dos componentes celulares durante a senescência, no caso de folhas ou flores ou durante a morte celular programada, como é o caso dos elementos do xilema (BASSHAN, 2007; LIU; XIONG; BASSHAM, 2008).

HOMEOSTASE DE METAIS PESADOS E DETOXIFICAÇÃO

Metais pesados geralmente poluem os solos, ou por eles estarem naturalmente presentes em altas quantidades nos solos ou devido à atividade humana. A maior parte do progresso feito no papel do vacúolo em transportar metais pesados, em manter a

homeostase e em detoxificar, tem sido feito com os micronutrientes zinco e ferro. A despeito do fato de que metais pesados são requeridos pelas plantas em várias organelas, é necessário que a planta mantenha baixas concentrações deles no citosol. O citosol não deve eliminar todo o zinco e ferro, mas as concentrações desses metais livres devem ser mantidas baixas para evitar os sintomas da toxicidade. Então esses elementos devem ser liberados dentro do citoplasma de maneira muito controlada para suprir as funções como cofatores enzimáticos (MARTINOIA et al., 2007).

FUNÇÕES DOS VACÚOLOS EM PLANTAS CAM

Na maioria de espécies de plantas, malato está envolvido numa quantidade extraordinária de funções, por exemplo, nas plantas CAM o malato é sintetizado a noite e entra no vacúolo (como ácido málico) temporariamente como um armazenador de dióxido de carbono. Em certas espécies CAM, um equivalente de 17% do total de massa seca das células atravessa o tonoplasto todo dia (HOLTUM et al., 2005 apud MARTINOIA et al., 2007). Então, não é surpresa que um número de modificações no vacúolo central de células CAM como tamanho e propriedades bioquímicas são requeridas para permitir desse modo intensos fluxos metabólicos (MARTINOIA et al., 2007).

2.6 TONOPLASTO

A membrana vacuolar, também denominada de tonoplasto, possui uma estrutura básica comum a todas as membranas celulares. Nela estão localizados os sistemas de transporte de uma variedade de substâncias (sistemas primários e secundários), sendo dessa forma considerada uma membrana funcional e altamente organizada (MAESHIMA, 2001).

Os sistemas primários de transportes das membranas são capazes de gerar um gradiente eletroquímico ao transportar íons contra um gradiente de concentração utilizando-se da energia liberada na quebra de ligações covalentes. Já os sistemas secundários, transportam íons e substâncias através da membrana, sem envolver a quebra de ligações covalentes, mas dependendo do gradiente eletroquímico de prótons gerado na membrana pelos sistemas primários (LOGAN et al., 1997).

Circuitos quimiosmóticos das células das plantas são dirigidos por gradientes de prótons mediado pela atividade de transporte de prótons secundária através da membrana plasmática e das membranas endossomais. O fluxo de soluto através da membrana plasmática depende da viabilidade da força próton motora. As P-ATPase exercem funções importantes que determinam o controle da aquisição de nutrientes e a distribuição destes na planta como um todo (GAXIOLA, 2007).

As bombas vacuolares de H^+ (V-ATPase e V-PPase), transportadores ativos primários, utilizam a energia proveniente da quebra de ligações de alta energia das moléculas de ATP e PPi, respectivamente, para transportar H^+ para o interior do vacúolo. Dessa forma, um gradiente de prótons ($\Delta\mu H^+$) é gerado, o qual tem como componentes a variação de pH (ΔpH) e a variação do potencial de membrana ($\Delta\Psi$). A entrada de prótons realizada por essas bombas gera um potencial elétrico de membrana positivo do lado interno em relação ao lado externo do tonoplasto, bem como uma variação de pH, onde a concentração de H^+ é maior no interior do vacúolo em relação ao meio citoplasmático. O gradiente gerado pelas bombas de prótons fornece energia para os transportadores secundários (MAESHIMA, 2001).

A capacidade do transporte de sódio do citoplasma para o vacúolo via antiporte Na^+/H^+ é dependente da atividade da V-ATPase e da V-PPase (WANG et al., 2001). Os contra-transportadores, presentes nas membranas vacuolares e plasmáticas, agem removendo íons Na^+ do citoplasma e transportando-os para o interior do vacúolo ou para fora da célula e dessa forma, previnem a toxicidade celular decorrente da acumulação excessiva de Na^+ (BLUMWALD et al., 2000). Entre os vários transportadores e canais encontrados em membranas vacuolares de células vegetais, as bombas de prótons têm sido particularmente bem caracterizadas a nível molecular (MAESHIMA et al., 1996).

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

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

Os contra-transportadores Na^+/H^+ são proteínas transportadoras que movem os íons Na^+ para fora da célula ou para o interior de organelas em troca de íons H^+ exercendo papel importante na homeostase celular do pH e da concentração de Na^+ . Nos últimos anos, avanços significativos foram feitos para esclarecer a estrutura e a função dos contra-transportadores Na^+/H^+ bem como os mecanismos essenciais das reações de troca e sua regulação (BLUMWALD; AHARON; APSE; 2000; HASEGAWA et al., 2000).

As evidências de que os contra-transportadores Na^+/H^+ exercem papel crucial na tolerância de plantas ao estresse salino têm aumentado nos últimos anos. Foram observados aumentos na tolerância de várias plantas ao estresse salino em decorrência da superexpressão do gene que codifica a proteína do contra-transportador Na^+/H^+ de tonoplasto (*AtNHX1*) em *Arabidopsis*, tomate, *Brassica*, trigo e arroz (APSE et al., 1999; FUKUDA et al., 2004; ZHANG; BLUMWALD, 2001; ZHANG et al., 2006).

Apesar de existirem vários tipos de transportadores nas membranas celulares, as bombas de prótons ocupam uma posição proeminente dentre todos transportadores, pois sem a força próton motora primária gerada para energizar e possibilitar o transporte de substâncias via carreadores ou canais de íons, todas as outras formas de transporte cessariam. Das três diferentes bombas ATPases das plantas: F-ATPase, V-ATPase e a P-ATPase, a H^+ -ATPase vacuolar (V-ATPase) é a mais complexa em relação à composição de subunidades (DIETZ et al., 2001). As V-ATPase possuem um ancestral comum com as F-

ATPases e a P-ATPase de archeobacterial e estão distribuídas em todos reinos de vida (GAXIOLA 2007).

2.7 V- H⁺- ATPase

As ATPases do tipo vacuolar foram assim denominadas devido ao fato de terem sido primeiramente caracterizadas em tonoplastos. A denominação permaneceu apesar de terem sido posteriormente encontradas em vários outros sistemas de endomembranas. A V-ATPase está sendo avaliada em vários organismos: plantas (RATAJCZAK, 2000 and SZE et al; 1992), fungos (FORGAC, 1999; STEVEN; FORGAC, 1997), *Neurospora crassa* (MARGOLLES-CLARK et al., 1999) e em mamíferos (FUTAI et al., 1999). Essas enzimas assemelham-se às F₀F₁ – ATPases (F-ATPase), não formam o complexo intermediário fosforilado e por um longo tempo foram conhecidas por serem insensíveis ao vanadato, distinguindo-se das P-ATPase, que formam um complexo intermediário ligado covalentemente ao fosfato. Uma relação evolutiva entre ATPase do tipo P e F é revelada por homologia seqüencial de algumas das subunidades. Porém, as V-ATPases representam uma classe única de H⁺-ATPases por terem um pH ótimo neutro em lugar de alcalino e por apresentarem um padrão de inibidores distintos. Elas são insensíveis a azida (BARKLA; PANTOJA, 1996; OTOCH, 1999) e mais sensíveis do que as F-ATPase ao nitrato, a bafilomicina A e Concanamicina C (MAESHIMA 2001). Logo, a atividade de hidrólise sensível ao nitrato e resistente a azida é usada para caracterizar a atividade V-ATPásica. Os valores de Km estão na faixa de 200 a 810 µM para diferentes V-ATPases (WANG; SZE, 1985). A V-ATPase exibe duas distintas atividades: a atividade de hidrólise de ATP e a atividade de transporte de H⁺. Através de investigações em vacúolos e vesículas de tonoplasto isoladas de plantas CAM (plantas com metabolismo do ácido crassuláceo) por análises termodinâmicas, uma relação estequiométrica de 2 H⁺ transportados / ATP hidrolisado foi sugerido para o acoplamento entre as atividades de transporte de H⁺ e hidrólise de ATP (SMITH; BLACK; 1984). A mesma relação foi determinada para a V-ATPase de *B. vulgaris* (BENNETT; SPANSWICK, 1984).

2.7.1 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DAS H⁺-ATPASES VACUOLARES

As V-ATPase são enzimas com multisubunidades composta por dois complexos: o complexo periférico V₁ consiste de oito subunidades (A, B, C, D, E, F, G e H) responsável pela hidrólise do ATP, e o complexo integral de membrana V₀ com seis subunidades (a, c, c', c'', d e e) responsável pela translocação de prótons (Figura 4) (GAXIOLA, 2007). Entretanto, o modelo estrutural baseado em microscopia eletrônica, das V-ATPase provenientes de todas as células eucarióticas incluindo plantas e das subunidades individuais determinadas por cristalografia de raio-X mostrou que a estrutura geral da V e F-ATPase é marcadamente similar sugerindo que elas podem também ter molde estrutural comum (DORY; NELSON, 2006 apud GAXIOLA et al., 2007).

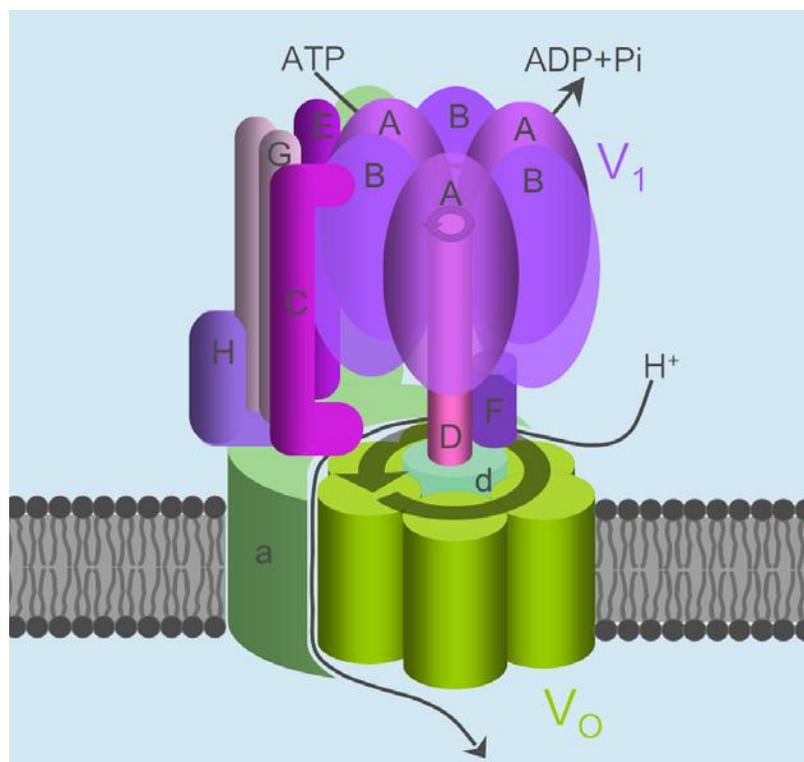


Figura 4. Modelo esquemático de uma V-ATPase de planta. O complexo periférico V₁ (roxo) e o complexo integral de membrana V₀ (verde) são ligados diretamente a uma haste periférica formada pelas subunidades VHA-a, -C, -E, -G e -H. A hidrólise do ATP pelo hexâmero VHA-AB conduzido sobre a rotação da haste central consistindo das subunidades VHA-D e VHA-F, junto com uma argola proteolipídica fita com cinco cópias da VHA-c e uma cópia da VHA-c''. A rotação da argola-c promove o transporte de H⁺ através da membrana (Gaxiola et al., 2007).

As V-ATPase de *Saccharomyces cerevisiae* constituem-se em um importante modelo para estrutura e função em todas as células eucarióticas. Entretanto, o fato que em plantas, como em todos os eucariotos superiores, muitas subunidades da V-ATPase são codificadas por famílias de genes, o que adiciona uma grande complexidade que não pode ser comparada com o modelo da levedura. Em *Arabidopsis*, 13 subunidades (nenhuma c' é encontrada em plantas) são codificadas por um total de 27 VHA-genes e se todas as combinações de isoformas fossem usadas nós teríamos centenas de complexos da V-ATPase (SZE et al., 2002 apud GAXIOLA, 2007). O número de subunidades varia de acordo com as espécies. Por convenção, as subunidades V_1 são designadas por letras que vão de A a G em uma ordem crescente de massa molecular. Três diferentes subunidades compõem o setor V_0 , duas delas são transmembranares (as glicoproteínas a e c) e uma hidrofílica porém fortemente ligada aos componentes integrais da membrana (FINBOW; HARRISON, 1997). O domínio V_1 pode ser dissociado do domínio V_0 por incubação da enzima em solução contendo agentes caotrópicos como carbonato alcalino, nitrato e MgATP ou choque frio na presença de MgATP. Nas V-ATPases de plantas superiores podemos encontrar certas diferenças estruturais. Acredita-se que haja mais de um tipo de V-ATPase em plantas. Os “componentes principais” (subunidade A, B e c) têm sido encontradas em todas as ATPases estudadas, sugerindo que essas subunidades seriam essenciais para o seu funcionamento. As demais subunidades apresentadas na literatura foram detectadas somente em certos materiais. As diferenças na composição de subunidades entre as V-ATPase de plantas sugerem que a composição das subunidades pode ser específica do tecido ou regulado pelo meio ou pelo desenvolvimento (LÜTTGE; RATAJCZAK, 1997). Essas subunidades estão distribuídas em dois setores (V_1 e V_0), descritas a seguir:

Subunidade A (VHA-A): a subunidade A de várias fontes de V-ATPase já foi clonada e seqüenciada e mostrou possuir uma variação em sua massa molecular de 67 a 73kDa. A subunidade A é uma subunidade catalítica, tem a função de catalisar a hidrólise do ATP. Baseado na análise do perfil de expressão, a subunidade A é um fator limitante da atividade da holoenzima e é expressa em baixo nível em condições normais, mas em condições de estresse salino a expressão pode aumentar rapidamente (ZHAO et al., 2009). Ela contém um sítio de ligação ao nucleotídeo e a ligação dessa subunidade a análogos de adenina (7-cloro-

4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3 diazol, 5'- isotiocianato ou N-etilmalleimida), inibe a atividade de hidrólise de ATP (WANG; SZE, 1985).

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

Subunidade C (VHA-C): a subunidade C é representada por polipeptídeos exibindo massas moleculares aparente de 37 a 52 kDa em géis de poliacrilamida. A função da subunidade C é estabilizar a ligação ente os domínios V_1 e V_0 e é induzida em diferentes estágios por estresse salino (ZHAO et al., 2009).

Subunidade D (VHA-D): a subunidade D tem massa de 29,1 kDa, e sua análise em leveduras revela similaridade estrutural à subunidade gama da F-ATPase embora não seja detectada similaridade significativa na seqüência (SZE et al., 1992). A subunidade D forma a eixo central da estrutura do domínio V_1 e é uma subunidade essencial para o transporte de prótons e hidrólise do ATP (XU; FORGAK, 2000 apud ZHAO et al., 2009).

Subunidade E (VHA-E): a subunidade E é encontrada sendo parte do setor periférico ou haste estatora responsável fisicamente e funcionalmente pela ligação do domínio periférico V_1 com o domínio V_0 de membrana (KAWAMURA et al., 2001; OHIRA et al., 2006) desta maneira, ela é muito importante para a montagem do domínio V_0 dentro da membrana (ZHAO et al., 2009).

Subunidade F (VHA-F): a subunidade F participa da formação da haste central, junto com a subunidade D. Ela exerce uma importante função estabilizando a interação entre V_1 e V_0 . A

alta ligação da subunidade F com a subunidade D sugere alguma interação entre essas duas subunidades, entretanto, a relação entre a estrutura e a função dessas duas subunidades ainda não está clara (ZHAO et al., 2009).

Subunidade G (VHA-G): a subunidade G é representada por um polipeptídeo de 12,5 kDa e possui similaridades de seqüências com a subunidade b da F-ATPase embora seja menor e não contenha um aparente domínio transmembrana no seu nucleotídeo N-terminal (SUPEKOVA et al.,1996). Como a subunidade b da F-ATPase, a subunidade G pode estar envolvida no acoplamento da hidrólise de ATP e transporte de H⁺ (RATAJCZAK, 2000). A subunidade G liga-se fortemente a subunidade E e o sal induz um aumento coordenado da expressão de ambas subunidades (ZHAO et al., 2009).

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

Subunidade c (VHA-c): a subunidade c constitui a estrutura chave do domínio V₀ e forma um hexâmero. É uma proteína altamente hidrofóbica contendo quatro domínios intramembrana, e tem sido sugerido que ela está diretamente envolvida no transporte de H⁺ (RATAJCZAK, 2000).

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

2.7.2 REGULAÇÃO DA V-ATPASE

Vários estudos têm sido realizados para esclarecer os elementos da rede de regulação fisiológica celular da V-ATPase em animais e plantas. Porém esse estudo é muito difícil, pois as observações experimentais são isoladas, algumas vezes contraditórias e freqüentemente aplicáveis somente em situações *in vitro*.

A atividade da V-ATPase está sujeita a regulação pós-traducional e tem sido sugerido que essa atividade em planta seja regulada por mecanismos diferentes: fosforilação das subunidades da V-ATPase (MARTINY-BARON et al., 1992), e modificação do estado redox da enzima, por oxidação e redução de grupos sulfidrilas essenciais presentes nas subunidades A e B da V-ATPase. Foi proposto também que mudanças na disponibilidade do substrato $MgATP^{2-}$ encontrado no citoplasma pode ser um importante fator para a regulação da atividade da V-ATPase (DIETZ et al., 1998). Como o domínio V_0 da V-ATPase está inserido na bicamada lipídica esse ambiente parece ser de crucial importância para a atividade da enzima. Yamanishi e Kasamo (1993) demonstraram a inativação da V-ATPase purificada pela remoção de lipídios usando cromatografia de troca iônica.

A V-ATPase de plantas possui várias isoformas de subunidades, assim como as V-ATPases de leveduras e mamíferos (FORGAC, 1999; FUTAI et al., 1999; STEVEN; FORGAC; 1997). Dois cDNAs codificando a subunidade c foram identificados em plantas de arroz, *Mesembryanthemum crystallinum* (SCHERER et al., 1988) e algodão (*Gossypium hirsutum*) (D'AUZAC, 1977) e três cDNAs foram identificados em *A. thaliana* (VERA-ESTRELLA et al., 1999). Duas isoformas foram ainda encontradas para as subunidades A (SCHERER et al., 1988), B (SCHERER et al., 1988) e G (AJ00502) de várias espécies de plantas. Além desses trabalhos, a presença de duas isoformas das subunidades D e E foram demonstradas em feijão e ervilha (RATAJCZAK, 1994). Segundo RATAJCZAR (2000), a regulação da atividade da V-ATPase pode ser exercida pela expressão de diferentes isoformas em diferentes tecidos ou no mesmo tecido em certas condições ambientais. A primeira evidência para uma regulação da expressão específica do tecido das isoformas da subunidade c veio de estudos em algodão (HASENFRATZ et al., 1995), em *M. crystallinum* cujo transcrito Vmac1 da subunidade c foi encontrado preferencialmente em folhas (TSIANTIS et al., 1996). Em *A. thaliana* dois genes da subunidade c (AVA-P1 e AVA-P2) são constitutivamente expressos em todos os tecidos testados enquanto que os níveis de mensagem de AVA-P3 e AVA-P4 são mais baixos e a expressão da AVA-P3 parece ser restrita ao ápice da raiz e do caule. Trabalhos recentes com manipulação das subunidades da V-ATPase indicam que a mesma é essencial para a morfogênese de *N. crassa* (subunidade A) (WARD; SZE, 1992) e para a fotomorfogênese de *A. thaliana* (subunidade C) (KLOPPSTECH, 1985) e para cenoura (subunidade A) (KAESTNER et

al., 1988).

Levando-se em conta as diferentes funções da V-ATPase no metabolismo celular pode-se propor a hipótese que algumas isoformas correspondem a genes de manutenção enquanto que outras são expressas dentro de condições de estresses ambientais. Contudo, está faltando evidências para confirmar a expressão de diferentes isoformas como resposta ao estresse ambiental ou à presença de diferentes isoformas em diferentes membranas celulares (RATAJCZAK, 2000).

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

Os níveis de mRNA das subunidades da V-ATPase e a quantidade dessa proteína são alterados em resposta aos estresses ambientais. Uma característica comum de proteínas vegetais altamente reguladas parece ser a oscilação endógena das quantidades de transcritos e tal oscilação foi demonstrada para a subunidade c da V-ATPase de *M. crystallinum* (ROCKEL et al., 1997). Pode-se supor que a subunidade c da V-ATPase e possivelmente outras subunidades pertençam ao grupo de proteínas altamente reguladas (RATAJCZAK, 2000). Dessa forma, é provável também que os genes da V-ATPase sejam altamente regulados.

2.8 V-PPase

Uma característica própria das plantas é a existência de vias metabólicas paralelas que usam tanto nucleotídeos quanto pirofosfato como fontes alternativas de energia. Essa maior versatilidade das plantas em relação aos mamíferos deve-se à presença de duas bombas que funcionam em paralelo em membranas de células vegetais. Uma delas é a V-

ATPase, a qual está presente em todos os eucariontes e a outra é a pirofosfatase (PPase) que têm sido encontrada em todas as plantas e em algumas bactérias fotossintetizantes (REA; POOLE; 1993). Diversas hipóteses são sugeridas para a existência de duas bombas numa mesma membrana: a) a V-PPase agiria como uma alternativa (“back-up”) para a V-ATPase em condições em que o fornecimento de ATP fosse limitado; b) que a V-PPase é reversível e pode usar o gradiente de H^+ que se estabelece através do tonoplasto para sintetizar PPI; ou c) que a energia livre, dissipada como calor por uma PPase solúvel, pode ser conservada como gradiente de prótons se a V-PPase agir como bomba *in vivo* (LEIGH et al., 1992).

2.8.1 Caracterização Inicial

A V-PPase foi primeiramente identificada em vacúolo, e daí então ela foi considerada uma enzima marcadora de vacúolo (CHANSON et al., 1985; REA; POOLE; 1985). A localização da V-PPase é ainda controversa, porém estudos recentes têm mostrado que a V-PPase é também encontrada em membrana plasmática, complexo de Golgi e retículo endoplasmático.

Essa enzima mostra-se não só necessária como suficiente para o transporte de H^+ dependente de PPI. A subunidade que se liga ao substrato funciona como um monômero durante a hidrólise de PPI (REA; POOLE, 1993), embora tenha sido proposto uma estrutura dimérica para a V-PPase funcional nativa (SATO et al., 1991). O primeiro cDNA da V-PPase foi clonado a partir de *A. thaliana* (SARAFIAN et al., 1992) através de exame imunológico de uma biblioteca de expressão. Desde então cDNAs foram clonados de várias plantas tais como: trigo (D13472) (TANAKA et al., 1993), beterraba (L32791, L32792) (KIM et al., 1994), tabaco (X77013, X83730, X83729) (LERCHL et al., 1995), arroz (D86306) (SAKAKIBARA et al., 1996), feijão (AB009077) (NAKANISHI; MAESHIMA, 1998) e abóbora (D86306) (MARUYAMA et al., 1998). A V-PPase dessas espécies de plantas consiste de 761-771 aminoácidos com *pI* de aproximadamente 5,0 e massas moleculares na faixa de 79,8 a 80,8 kDa. As seqüências de aminoácidos são altamente conservadas entre as plantas terrestres com 86-91% de identidade.

As prótons-pirofosfatases (H^+ -PPase) são bombas de prótons eletrogênicas que acidificam vacúolos em células vegetais. O substrato para as H^+ -PPases, o PPI, é um subproduto de vários processos metabólicos, como a polimerização de DNA e RNA, síntese de aminoacil-tRNA, formação de ADP-glicose e UDP-glicose, (MAESHIMA, 2000), conversão do piruvato em fosfoenolpiruvato (MARTINOIA, et al., 2007).

Em meados dos anos 70, Karlsson demonstrou uma atividade PPásica estimulada por K^+ e Walker; Leigh (1981) caracterizaram uma PPase dependente de Mg^{2+} . Somente em 1985 é que finalmente identificaram que o transporte de H^+ dependente de PPI era mediado por uma PPase e não um V-ATPase, capaz de usar PPI em algumas circunstâncias. Seguidas caracterizações mostraram que, essa PPase diferia da V-ATPase em vários aspectos: a PPase era estimulada pelo K^+ enquanto que a V-ATPase era seletivamente ativada por halógenos; nem a hidrólise nem o transporte de prótons pela PPase eram inibidos pelo nitrato; finalmente foi mostrado que a PPase era específica para $MgPPi$ (ou Mg_2PPi) como substrato enquanto que a V-ATPase não mostrava nenhuma atividade em relação a esse composto.

A V-PPase consiste de um polipeptídeo simples que é encontrado em plantas, algas, bactérias fotossintéticas, protozoários e archeobactérias, mas não é encontrado em fungos (MARTINOIA, et al., 2007). São altamente hidrofóbicas, consistindo de 14 a 17 domínios transmembranares α -hélice, com massa molecular de aproximadamente 80 kDa e sua função está relacionada a geração de um gradiente de prótons através de endomembranas usando a energia da ligação do fosfoanidrido das moléculas de pirofosfato (PPI) (Figura 5). As plantas possuem dois tipos filogeneticamente distintos de V-PPase: tipo I, que é dependente de K^+ citosólico para a sua atividade e são moderadamente sensíveis à inibição por Ca^{2+} , e a do tipo II, que são insensíveis ao potássio mas extremamente sensíveis ao Ca^{2+} (GAXIOLA, et al., 2007).

A região catalítica da V-PPase contém um sítio ligante de Mg -PPI que é responsável pela hidrólise do PPI e adicionalmente existem cinco voltas citoplasmáticas que são responsáveis pela conversão da energia da hidrólise, três dos quais estão conservados em todas as PPases (GAXIOLA, et al., 2007). Geralmente, a atividade da V-PPase é maior em

tecidos jovens, entretanto, em alguns casos a V-PPase é também a bomba de próton predominante em células de plantas maduras (MARTINOIA, et al., 2007).

O teor da V-PPase varia de acordo com as condições fisiológicas e em resposta a estresses ambientais. O mecanismo regulatório da expressão gênica da V-PPase e a regulação pós-traducional ainda não estão elucidados. A PPase vacuolar de plantas é uma das raras enzimas encontradas em vegetais que pode fornecer informações úteis no âmbito da Biologia Molecular e da Bioenergética (MAESHIMA, 2000).

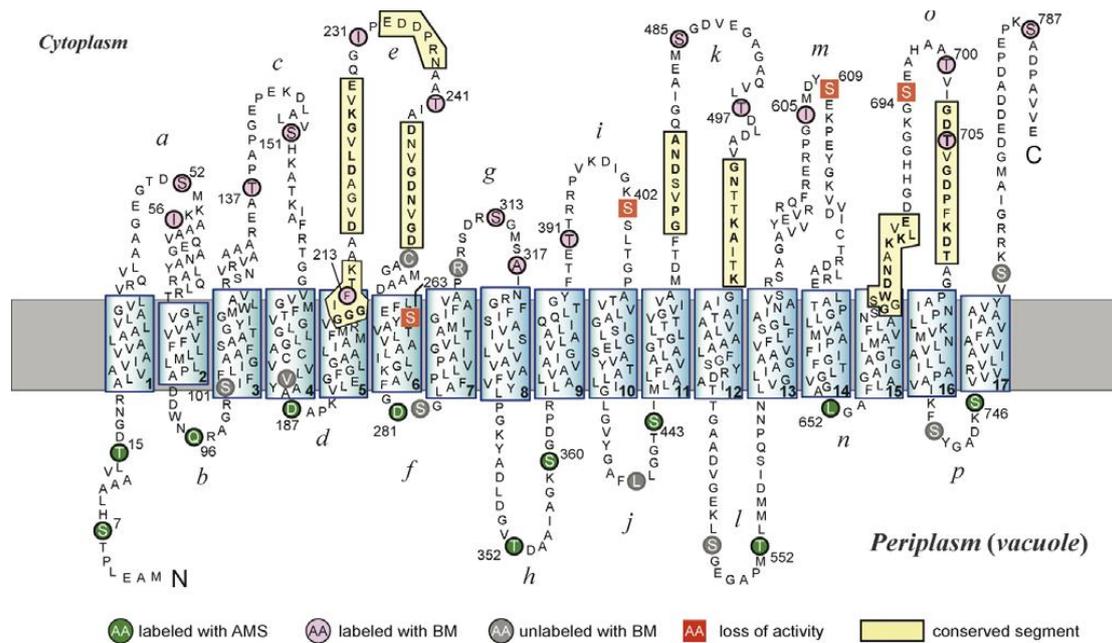


Figura 5: Modelo da topologia da H⁺PPase de membrana da *Streptomyces coelicolor*. Os domínios transmembrana (1-17) são as caixas numeradas. Regiões conservadas, como a DVGADLVGKVE, são marcadas com caixas amarelas. Esta é uma versão modificada da figura 8 mostrada por Mimura et al., 2004 (Gaxiola et al., 2007).

2.8.2 ATIVIDADE E DISTRIBUIÇÃO

As atividades, tanto de transporte de prótons dependente de PPI quanto a de hidrólise estimulada por K⁺ e/ou insensível a molibdato, têm sido demonstrada em membranas vacuolares da maioria dos tipos principais de plantas vasculares (plantas monocotiledôneas, dicotiledôneas, C3, C4 e CAM) como também em seus prováveis

ancestrais, as algas clorófitas. Além disso, a V-PPase é o componente principal das membranas vasculares capaz de gerar um $\Delta\mu\text{H}^+$ de magnitude igual ou superior ao da V-ATPase (MAESHIMA; YOSHIDA, 1989). A estimativa do teor das enzimas sugere que as mesmas constituem de 1% (*Beta vulgaris*) a 5-10% (*Vigna radiata*) da proteína total da membrana vacuolar (MAESHIMA; YOSHIDA, 1989).

As membranas vacuolares preparadas de várias espécies de plantas, de musgos, de samambaias e de algas, apresentam atividades V-PPásicas além de atividade V-ATPásica (NAKANISHI; MAESHIMA; 1998). Notáveis exemplos de PPases transportadoras ou conservadoras de energia são as PPases reversíveis transportadoras de prótons encontradas em cromatóforos de bactérias não sulfurosas, *Rhodospirillum rubrum*, as PPases transportadoras de prótons vacuolares de células vegetais e a PPase associada a membrana animal e de mitocôndria de levedura. Essa última, porém, apresenta padrões de sensibilidade a inibidores bem diferentes das duas primeiras (BAYKOV et al., 1993). Baseado nesses resultados, considera-se que as PPases associadas à mitocôndria pertençam a um grupo distinto de PPases (BAYKOV et al., 1993).

2.8.3 PPI COMO FONTE DE ENERGIA

O teor da V-PPase em plantas necessita de um fornecimento regular de PPI citossólico e uma relação de massa de PPI:Pi favorável à translocação de prótons. O nível de PPI em tecidos vegetais varia na faixa de 5-39 nmoles/g de peso fresco (SMYTH; BLACK, 1984) e esse PPI parece está quase limitado ao citosol. Já foi calculado que em folhas de espinafre e protoplasto de mesófilo de trigo, o PPI citossólico é de 200 a 300 μM (WEINER et al., 1987), enquanto que, em outras organelas como vacúolo e cloroplasto da alga, *Chara*, foram detectados menos de 1 e de 2 a 3 μM respectivamente, contra 193 μM para o citosol (TAKESHIGE; TAZAWA; 1989). Considerando uma estequiometria de H^+ : PPI igual a 1, considera-se que a energia livre liberada pela hidrólise de PPI citossólico excede o mínimo teórico requerido para energização vacuolar.

2.8.4 REGULAÇÃO DA V-PPASE

Os níveis de V-PPase em plantas são regulados em condições de estresse. Colombo e Cerana (1993) relataram um aumento da atividade da V-PPase em suspensão de células de cenoura em condição de estresse salino (NaCl) e examinando o efeito dos nutrientes minerais como, K^+ , NO_3^- e Ca^{2+} em raiz de centeio perceberam que as atividades de hidrólise de PPI e PPI dependente de H^+ crescem em plantas com déficit de minerais. Foi demonstrada a importância da V-PPase em células de plantas sob o efeito do estresse causado pela anoxia e pelo frio (REA; POOLE 1993). Eles propuseram que a V-PPase pode substituir a V-ATPase sob condição de estresse energético para manter o vacúolo acidificado. Nessas condições ambientais severas, as plantas que são sensíveis a baixas temperaturas sofrem sérias injúrias pelo frio.

Uma função importante das V-PPase no crescimento e no desenvolvimento foi apresentada pelo estudo do desenvolvimento da pêra, mostrando que os níveis de proteína e de atividade do tipo I da V-PPase aumentaram no fruto jovem e em células em divisão. Também foi mostrado que a superexpressão da PPase tipo I AVP1 em *Arabidopsis* resultou no aumento da divisão celular no começo da formação dos órgãos e aumentou o transporte de auxina (GAXIOLA et al., 2007).

Em um diferente cenário fisiológico, a estimulação da atividade das bombas de prótons, da ATPase vacuolar de *Kalanchoe blossfeldiana* pela ativação da V-PPase foi mostrada durante o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) (GAXIOLA et al., 2007). A regulação transcricional de dois genes da PPase de cevada (*HVP1* e *HVP10*), um gene que codifica a subunidade catalítica da V-ATPase vacuolar (*HvVHA-A*) e um gene codificando para o contra-transportador Na^+/H^+ (*HvNHX1*) foi monitorado em resposta a adição exógena de ácido abscísico (ABA), auxina e giberelina (GA). Enquanto todos os genes foram induzidos pelo tratamento com o ABA, a giberelina não teve efeito. A auxina induziu a expressão dos genes de *HVP1* e *HvNHX1* mas não dos genes *HVP10* e *HvVHA-A* sugerindo que hormônios específicos modulam a operação de regulação das bombas de prótons vacuolares (FUKUDA; TANAKA; 2006).

Uma conexão entre um sinal de tradução de óxido nítrico e um aumento da tolerância ao sal em milho via estimulação da atividade da V-PPase e da V-ATPase foi demonstrado (ZHANG et al., 2006) porém, não está claro se o aumento das atividades das bombas de prótons é devido a mudanças na quantidade ou na regulação da função (GAXIOLA et al., 2007).

A superexpressão da *HVP1* em *Arabidopsis* resultou em plantas com aumento da tolerância ao sal e resistência a seca. O fenótipo dessas plantas tolerantes ao sal foi explicado pelo aumento da entrada de Na^+ no interior do vacúolo e o fenótipo relatado a seca foi originalmente atribuído ao aumento da capacidade osmorregulatória vacuolar (GAXIOLA et al., 2001).

2.9 CONTRA-TRANSPORTADOR VACUOLAR

O contra-transportador Na^+/H^+ (trocador) catalisa a troca de Na^+ por H^+ através das membranas. Ele regula o pH interno, volume da célula e o nível de sódio no citoplasma, e mantém a homeostase iônica intracelular (LI et al., 2008). Apesar de os contra-transportadores terem sido encontrados em animais, leveduras, bactérias e plantas, a atividade deles em membranas vacuolares somente tem sido reportada em leveduras, algas e plantas (BLUMWALD et al., 2000 apud FUKUDA et al., 2004). Tem sido demonstrado para muitos transportadores que membros de muitas famílias podem estar localizados na membrana vacuolar bem como na membrana plasmática. Existe, por exemplo, o das aquoporinas (TIP e PIP), Ca^{2+} -ATPase, MTPs (*AtMTP1* é de tonoplasto e *AtMTP4* reside na membrana plasmática), transportadores ABC, e NHX (MARTINOIA et al., 2007). A presença de muitos transportadores similares nas duas membranas indica que as plantas têm como escolher que componentes excretar os quais não são requeridos ou quais inibem o metabolismo dentro do apoplasto (excreção), ou para transportá-los para dentro do vacúolo (excreção interna). A excreção do apoplasto bem como uma excreção interna provém de condições ótimas do metabolismo celular, entretanto, o resultado é diferente (MARTINOIA et al., 2007).

Em plantas, o contra-transportador Na^+/H^+ da membrana vacuolar transporta Na^+ do citoplasma para o vacúolo usando o gradiente de prótons gerado pelas duas bombas de prótons (V-ATPase e V-PPase). As células de plantas tratadas com alta salinidade podem manter uma alta taxa K^+/Na^+ no citoplasma e controlar o balanço osmótico na célula e a acumulação de Na^+ ambiental nos vacúolos (FUKUDA et al., 2004). A compartimentalização do Na^+ e do Cl^- no vacúolo também contribui para a manutenção do “status” de água da célula, junto com solutos orgânicos que são os principais osmólitos acumulados no citosol e nas organelas para balancear o “status” osmótico intracelular das células de plantas crescidas em sal (YOKOI et al., 2002).

O primeiro contra-transportador Na^+/H^+ vacuolar identificado foi o *AtNHX1* (GAXIOLA, 1999) membro de uma família de seis genes (*AtNHX1* – *AtNHX6*) que mostra sequências homólogas para mamíferos *NHE* e contra-transportadores de leveduras *NHX1* e contêm um domínio ligante consenso FF(i/L0(Y/F)LFLLPPI amiloride (YOKOI et al., 2002). Vários genes de contra-transportador Na^+/H^+ foram identificados em *Oryza sativa* (FUKUDA et al., 1999), *Mesembrianthemum crystallinum* (CHAUHAN et al., 2000), e *Atriplex gmelini* (HAMADA et al., 2001). O aumento da expressão de genes antiporte por estresse salino foi mostrado em glicófitas, *A. thaliana* e *O. sativa* e em halófitas *M. crystallinum* e *A. gmelini*. A atividade também é ativada pelo estresse salino em plantas tolerantes ao sal como cevada e *Beta vulgaris*. A atividade do contra-transportador Na^+/H^+ vacuolar bem como os genes *NHX* foram encontrados em outras espécies de plantas como cana-de-açúcar (BARKLA et al., 1990), *Ipomoea nil* (OHNISHI et al., 2005; YAMAGUCHI et al., 2001), girassol (BALESTEROS et al., 1997) e nas halófitas *Suaeda salsa* (MA et al., 2004) e *Thellungiella halophila* (VERA-ESTRELA et al., 2005). Esses resultados indicam que o contra-transportador Na^+/H^+ exerce função importante na tolerância ao sal em uma ampla variedade de plantas (FUKUDA et al., 2004).

A superexpressão de *AtNHX1* aumentou a tolerância ao sal em *A. thaliana* (ASPE et al., 1999), em tomate (ZHANG; BLUMWALD, 2001), arroz (OHTA et al., 2002), *Brassica napus* (ZHANG et al., 2001), trigo (XUE et al., 2004) e algodão (HE et al., 2005) e esse contra-

transportador catalisa a troca de Na^+/H^+ bem como a troca de K^+/H^+ (VENEMA et al., 2002; ZHANG; BLUMWALD, 2001; ZAHRAN et al., 2007).

2.9.1 REGULAÇÃO DO NHX

A existência de uma família gênica de *NHX* em *A. thaliana* composta por seis genes funcionais que codificam o contra-transportador Na^+/H^+ indica que as plantas possuem uma necessidade crítica para regular a homeostase do Na^+ através da compartimentalização vacuolar. Foi demonstrado que mutantes *nhx1* exibem um fenótipo alterado em condições normais de crescimento, incluindo células pequenas, folhas pequenas e outras irregularidades no desenvolvimento associado com alterações na homeostase do K^+ levado pela necessidade de *AtNHX1*. Esses resultados sugerem que *AtNHX1* está associado com outros processos celulares que não necessariamente relatados com a tolerância ao sal (SOTTOSANTO; SARANGA; BLUMWALD; 2007). Um estudo da expressão de genes *NHX1* durante o desenvolvimento das plantas de *Vitis vinifera* foi feito por Hanana et al., 2007. Os resultados mostraram que o transcrito de *VvNHX1* não foi detectado em estágios iniciais do desenvolvimento da semente. Altos níveis de transcritos foram detectados em sementes robustas após o estágio de 100 a 120 dias após a floração, e um baixo conteúdo de transcrito foi detectado nos tecidos de pele vermelha.

Alternativamente o contra-transportador possui outra função essencial para a célula como o transporte de K^+ (YOKOI et al., 2002). Além do mais, ele também participa na coloração das flores. A substituição de botões de rabanete púrpuro por azul na abertura das flores em plantas tipo selvagens é correlatado com um aumento do pH vacuolar. O gene *InNHX1* (*Ipomoea nil*) é expressado mais abundantemente no limbo das flores e moderadamente expressado em no tubo das flores e estames em torno de 12 horas da abertura das flores. Nenhuma expressão do gene *InNHX1* em folhas, caules e raízes em resposta ao tratamento com NaCl foi observado. Entretanto, o gene *InNHX2* possui uma função dupla, por um lado confere tolerância ao sal e por outro lado promove a alcalinização parcial nas pétalas das flores. Esta última provavelmente é responsável pela conversão do

botão floral em uma flor aberta por um aumento parcial do pH vacuolar (OHNISHI et al., 2005).

O estudo da expressão de genes *NHX* em plantas de *Medicago intertexta* e de *Melilotus indicus* submetidos a diferentes concentrações de NaCl foi avaliado por Zahran et al., 2007. Em *M. indicus*, a expressão de *MtNHX1*, *MtNHX3* e *MtNHX4* não mudou significativamente após o tratamento com NaCl, exceto para uma diminuição da expressão de *MtNHX3* em folhas tratadas com 400 mM de NaCl e para uma expressão induzida por NaCl de *MtNHX1* em raízes. Entretanto, a expressão de *MtNHX1*, *MtNHX3* e *MtNHX4* foi claramente induzida pelo tratamento com o sal em folhas e raízes de plantas.

Em trigo foi demonstrado que a expressão de *TaNHX2* é induzido por estresse salino. Por outro lado o ácido abscísico induz a expressão de *TaNHX2* assim como também tratamentos osmóticos e de baixas temperaturas. Isto indica que *TaNHX2* possui função em resposta a vários estresses abióticos e a tratamento com ABA (YU et al., 2007).

A superexpressão do contra-transportador vacuolar Na^+/H^+ e da V-PPase resultou no aumento da tolerância das plantas tanto em estresse salino (ASPE et al., 1999; ZHANG; BLUMWALD, 2001) quanto em seca (GAXIOLA et al., 2001). Esses resultados indicam que plantas transgênicas forneceram a força adicional que dirigiu a acumulação de Na^+ vacuolar via contra-transportador Na^+/H^+ (MARTINOIA et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Estudar o papel das bombas de prótons (V-ATPase e V-PPase) e dos contra-transportadores vacuolares (NHX) em *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5 nos mecanismos de adaptação a estresses abióticos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Determinar o peso fresco das plântulas (raiz, hipocótilo e folhas) do cultivar Vita 5 de *V. unguiculata* submetidas a estresse salino por 6, 12 e 24 horas;

Quantificar o teor de Na⁺ e de K⁺ em raízes, hipocótilos e folhas de plântulas de *V. unguiculata* cv. Vita 5 submetidas a estresse salino por 6, 12 e 24 horas;

Avaliar os níveis de transcritos dos genes da V-PPase, das subunidades A e E da V-ATPase e do NHX2 e do NHX6 em folhas e raízes de plântulas de *V. unguiculata* cv. Vita 5 com 6, 12 e 24 horas de aplicação dos estresses salino e osmótico;

Clonar e sequenciar os genes das bombas de prótons (*VuVHA-A* e *VuHVP*) e dos contra-transportadores vacuolares (*VuNHX1*, *VuNHX2*, *VuNHX3* e *VuNHX6*) de *Vigna unguiculata*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Vegetal

Foram utilizadas sementes de feijão de corda *Vigna unguiculata* (L.) Walp, anteriormente denominada *Vigna sinensis* (L.) Savi e corrigida segundo Verdcourt (1970). As sementes de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 fornecidas pelo Banco de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, foram imersas, por 5 minutos, em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5%, para remoção de possíveis esporos de fungos presentes no tegumento das sementes, sendo em seguida lavadas exaustivamente em água corrente para remoção do NaOCl. Após esse tratamento as sementes foram imersas em água destilada, por um período de 1-2 horas, até que atingissem, aproximadamente, o dobro do tamanho inicial. Esse tratamento visava possibilitar uma germinação mais uniforme. A germinação das sementes foi feita em papel de filtro, com 20 a 25 sementes por ¼ de folha embebida com água destilada, no escuro à temperatura controlada (25°C), por três dias e posteriormente as plântulas eram transferidas para um sistema de hidroponia.

4.2. Sistema de Hidroponia

O sistema de hidroponia utilizado para o desenvolvimento de plantas de *V. unguiculata* era constituído por um recipiente revestido por papel alumínio para evitar a passagem de raios de luz e consequente absorção destes pelas raízes, assim como um sistema de bombeamento de ar para evitar a desoxigenação do meio nutritivo. No experimento completo foram utilizados três recipientes, sendo um para a condição controle, outro para o NaCl 100 mM e outro para o polietileno glicol 6000 (PEG) 200,67 g/L.

4.2.1 – Solução nutritiva

A solução nutritiva utilizada foi a de Hoagland's contendo: KNO₃ (1M), NH₄H₂PO₄(1M), MgSO₄(1M), Ca(NO₃)₂ (1M), Fe-EDTA 0,5% e micronutrientes.

Após a fixação das plantas no sistema de hidroponia, os recipientes hidropônicos foram transferidos para uma casa de vegetação com temperatura média de 30⁰ C .

4.2.2. Estresse salino e osmótico em plantas de *Vigna unguiculata*

Após 4 dias de crescimento das plantas em casa de vegetação os estresses foram adicionados. As plantas em condição controle cresceram em meio nutritivo na ausência de NaCl e de PEG e as plantas em condição de estresse cresceram em meio nutritivo contendo NaCl 100 mM ou PEG 200,67 g/L. Após 0, 6, 12 e 24 horas de estresse as plantas foram coletadas e utilizadas imediatamente ou foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -75⁰ C para posterior uso.

4.3. Parâmetros de crescimento

O efeito do NaCl 100 mM nas plântulas de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 foi avaliado através da medida de peso fresco. As diferentes partes das plântulas (raiz, hipocótilo e folhas) foram cortadas e pesadas em balança analítica.

4.4. Dosagem de Íons Na⁺ e K⁺

A determinação do conteúdo de íons Na⁺ e K⁺ foi feita utilizando fotômetro de chama. As amostras de raízes, hipocótilos e folhas foram diluídas 20 a 40 vezes com águas deionizada e lidas em fotômetro de chama (Micronal, modelo B462) calibrado com soluções padrões de Na⁺ e K⁺ 50 ppm. As amostras secas das raízes, hipocótilos e folhas foram maceradas com gral e pistilo e mantidas em tubos plásticos fechados à temperatura ambiente até a determinação do conteúdo de Na⁺ e K⁺. As amostras de 50 mg de massa seca foram extraídas com 10 mL de água deionizada a 100⁰ C por 60 minutos em tubos hermeticamente fechados. Após resfriamento, os extratos foram filtrados em algodão e as leituras foram realizadas no fotômetro de chama sob as mesmas calibrações.

4.5. Extração de RNA total de folhas e raízes de plântulas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp

A extração de RNA total de folhas e raízes de *V. unguiculata* cv. Vita 5, submetido a diferentes tratamentos: controle, NaCl 100 mM e PEG 200,67 g/L foi feita utilizando o “RNeasy Plant Mini Kit” de acordo com as instruções do fabricante.

As folhas e as raízes de *V. unguiculata* (200 mg) foram cortadas em pequenos pedaços e maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo até a obtenção de um pó fino, e então transferido para um tubo eppendorf contendo 900 µl de tampão RLC e 20 µL de β-mercaptoetanol. A mistura no eppendorf foi homogeneizada por uma vigorosa agitação em “vortex”. A amostra homogeneizada foi aplicada numa mini coluna de “kit” (“QIAshedder spin column”- lilás, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e em seguida centrifugada à 10.000 rpm por 2 minutos à temperatura ambiente em uma centrífuga Sorvall Biofuge *pico*. Um total de 900 µL do eluato foi então recuperado, transferido para um novo tubo eppendorf de 2 mL e adicionado 0.5 volume de etanol 95% (450 µL) misturando com pipeta. Posteriormente, transferiu-se o volume dessa mistura para a coluna de fixação de RNA (“RNeasy mini spin column” – rosa, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e centrifugou-se a 10 000 rpm por 15 segundos. O eluato foi descartado, adicionou-se 700 µL de tampão RW1 à coluna e centrifugou-se novamente a 10.000 rpm durante 15 segundos, para lavagem. A coluna foi em seguida transferida para um novo tubo coletor e submetida a duas centrifugações de 10.000 rpm durante 15 segundos e 2 minutos, respectivamente, com 500 µL de RPE. Os eluatos e o tubo coletor foram descartados, a coluna foi reutilizada com um novo tubo coletor de 1,5 mL e o RNA foi eluído da coluna com 40 µL de água livre de RNase centrifugando-se à 10000 rpm por 1 minuto. O RNA total foi quantificado, analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% e armazenado à -20 °C para subseqüentes reações de RT-PCR.

4.6. Quantificação de RNA Total

A quantificação do RNA foi realizada através de leitura espectrofotométrica, fazendo uma varredura de 230 a 320nm, utilizando espectrofotômetro da marca PHARMACIA

BIOTECH, modelo ULTROSPEC 2000. Para observação do grau de pureza do RNA usou-se a relação (D.O260/D.O280). O fator de diluição da amostra foi de 100 (2 µL da amostra em 198 µL de água milli-Q), sendo a concentração obtida pela expressão abaixo:

1 D.O em 260 nm indica uma concentração de 40 µg/ml

$$[\text{RNA}] = 40\mu\text{g/mL} \times D \times A_{260}$$

onde,

D - Fator de diluição usado para fazer a leitura;

A₂₆₀- Leitura obtida no comprimento de onda de 260 nm.

4.7. Eletroforese do RNA Total

Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% diluído em tampão MOPs 1X para observação das bandas correspondentes às subunidades ribossomais. A eletroforese foi realizada em aparelho da marca PHARMACIA modelo GNA 100 (7.5x10cm) utilizando-se uma fonte regulável de corrente contínua BIO RAD (Power - pac 300) com amperagem constante 50 mA por aproximadamente 30 minutos à temperatura de 25°C. Foi aplicado no gel o equivalente a 0,5 µg da amostra de RNA total das folhas e das raízes. O gel foi tratado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) por aproximadamente 15 minutos e as bandas foram detectadas pela emissão de fluorescência obtida pela exposição do gel a raios ultravioleta.

4.8. Escolha dos oligonucleotídeos para as RT-PCRs

A expressão de mRNA da V-PPase e da subunidade A da V-ATPase foi avaliada através da utilização de *primers* específicos para *Vigna unguiculata*, cujas seqüências de cDNA estão disponíveis no GenBank [(cDNA da subunidade A da ATPase – **DQ056751**, gene da PPase – **DQ056749**)]. Para avaliação da expressão de mRNA da subunidade E da ATPase foram utilizados *primers* degenerados e para os genes NHX foram utilizados *primers* específicos (senso) e *primers* degenerados (anti-senso) desenhados a partir de seqüências nucleotídicas

desses genes, que já foram obtidas em outras espécies de plantas e que estão disponíveis no banco de dados GenBank (*National Center for Biotechnology Information*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As seqüências foram alinhadas e a homologia foi determinada através do programa ClustalW (http://www.infobiogen.fr/services/analyseseq/cgi-bin/clustaw_in.pl) e de dados obtidos a partir do banco EST no *advanced* BLAST (www.ch.embnet.org/software/bottomBLASTadvanced.html). Os oligonucleotídeos foram então escolhidos, em regiões conservadas entre diferentes espécies de plantas.

4.9. RT-PCR

A reação de transcrição reversa é catalisada pela enzima transcriptase reversa, que realiza um processo ao contrário em relação ao padrão celular. Essa enzima sintetiza moléculas de DNA a partir de moléculas de RNA, exatamente o oposto do que geralmente ocorre nas células, nas quais é produzido RNA a partir de DNA. O DNA sintetizado a partir de uma molécula de RNA pela enzima transcriptase reversa é conhecido como cDNA.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste na amplificação de uma determinada região de uma molécula de DNA. Qualquer região da molécula de DNA pode ser amplificada, desde que as seqüências nas extremidades sejam conhecidas, pois a enzima DNA polimerase necessita de iniciadores para as reações de síntese; Os iniciadores são oligonucleotídeos que possuem a capacidade de se hibridizar com a molécula de DNA, em cada uma das fitas da hélice. Já na RT-PCR, o molde para a reação de polimerização em cadeia é a molécula de RNA. O primeiro passo em uma RT-PCR é converter a molécula de mRNA em um cDNA de fita simples através da ação da transcriptase reversa (BROWN, 2003). Uma vez que o cDNA foi obtido pela transcrição reversa, o passo seguinte foi a amplificação desse cDNA utilizando a técnica de PCR que envolve várias etapas:

1. Desnaturação: o aquecimento à temperatura próxima da ebulição (94 °C) desnatura o DNA alvo e cria um conjunto de moldes de fita simples. O aquecimento aumenta a energia cinética da molécula de DNA a um ponto mais alto que a energia necessária para a

manutenção das pontes de hidrogênio entre os pares de bases. O DNA dupla fita é separado em fita simples.

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

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

Um fragmento de cDNA de todos os genes estudados (*VuVHA-A*, *VuVHA-E*, *VuHVP*, *VuNHX1*, *VuNHX2*, *VuNHX3* e *VuNHX6*) foi obtido da reação da Transcriptase Reversa a partir de RNA total de *V. unguiculata* e do oligo dT₁₈ como iniciador. Posteriormente o produto da transcrição reversa (RT) foi amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase I) usando os *primers* específicos/degenerados de cada gene. A reação de transcrição reversa foi feita de acordo com a tabela 1:

Tabela 1 – Mistura de reação de transcrição reversa (RT)

H2O livre de nucleases	Volume final de 20 µL
Tampão 5X	4 µL
MgCl ₂ 25 mM	2,4 µL
dNTP 10 mM	1 µL
Oligo dT ₁₈	3 µL
RNA _{total} (2µg)	Volume equivalente a 2 µg
Transcriptase Reversa	1 µL

A mistura de reação da RT continha água livre de nucleases, tampão, MgCl₂, dNTPs, oligo dT₁₈ e RNA que foram adicionados a tubos eppendorf e seguida foram colocados a 65 °C por 5 minutos e depois colocados no gelo por aproximadamente 2 minutos. Em seguida

foi adicionado a transcriptase reversa e então os tubos foram colocados a 42 °C por 1 hora para que se procedesse a reação da transcrição reversa. Após esse tempo, os tubos foram colocados a 75 °C por 15 minutos para a desnaturação da transcriptase reversa e em seguida armazenados a 4 °C. Posteriormente, o produto de RT foi amplificado por PCR como mostrado na tabela 2:

Tabela 2: Mistura de reação de PCR

<i>Produto de RT</i>	<i>1 μL</i>
H2O Milli-Q autoclavada	15,9 μL
dNTP 5 mM	1 μL
Primer F	1 μL
Primer R	1 μL
Tampão 5X	5 μL
Taq polimerase	0,1 μL

Para avaliar a amplificação dos genes por PCR o programa de PCR utilizado foi semelhante para todos os genes (Tabela 3), variando apenas na temperatura de anelamento e no tempo de extensão uma vez que os genes possuem diferentes tamanhos e diferentes temperaturas de anelamento. A amplificação foi feita em 25 ciclos para todos os genes, com exceção do *NHX6* cuja amplificação foi feita com 40 ciclos.

Tabela 3: Programa de PCR utilizado para amplificação de cDNA das bombas de prótons e dos contra-transportadores vacuolares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

Etapa	Temperatura (°C)	Temo (min)
Desnaturação	93	3
Anelamento	55 à 62,5	1
Alongamento	72	1 à 2
Extensão	72	5
Armazenamento	4	α

4.10. Eletroforese do cDNA amplificado da PPase e das subunidades A e E da ATPase e dos contra-transportadores (NHX) de *Vigna unguiculata* (L.) Walp

Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1%, para observação das bandas correspondentes aos cDNAs da ATPase e da PPase de *Vigna unguiculata* (L.).

Foi utilizado um gel de agarose 1% e TBE (1X) como tampão de corrida. Foi aplicado no gel 5 µL do produto da RT-PCR para uma melhor visualização das bandas. A eletroforese foi realizada em aparelho da marca PHARMACIA modelo GNA 100 (7.5x10cm) utilizando-se uma fonte regulável de corrente contínua BIO RAD (Power - pac 300) com amperagem constante 50 mA por aproximadamente 30 minutos à temperatura de 25⁰C. O gel foi tratado com brometo de etídio (0,5µg/ml) por aproximadamente 15 minutos e as bandas foram detectadas pela emissão de fluorescência obtida pela exposição do gel a raios ultravioleta.

4.11. PCR em condições saturadas visando clonagem e purificação dos fragmentos amplificados genes

Para obtenção dos genes de interesse para clonagem foi feita uma eletroforese em condições saturadas, maior volume do produto de RT (2µL), um número maior de ciclos (45 ciclos) para um volume total de 100 µL. Após a amplificação, ao produto de PCR foi adicionado 10 µL de tampão da amostra e então submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1% e TBE 1X como tampão de corrida. A eletroforese foi realizada em aparelho indicado no item 3.10, com amperagem constante 50 mA por aproximadamente 30 minutos à temperatura de 25⁰C. Ao término da corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e as bandas visualizadas que correspondiam ao tamanho esperado do gene foram cortadas do gel e em seguida submetidas a um processo de purificação utilizando o kit QIAEX II de acordo com as instruções do fabricante.

4.12. Purificação do Produto de RT-PCR

As bandas cortadas do gel foram colocadas em um tubo eppendorf, pesadas e em seguida foram adicionados três volumes do tampão QXI adicionado de 10 µL do tampão QXII. A amostra foi então incubada à 50 °C por 10 minutos homogeneizando em vortex a cada 2 minutos, para solubilizar a agarose e em seguida centrifugado por 30 segundos a 13000 rpm em centrífuga Sorvall Biofuge *pico*. O precipitado foi recuperado e lavado duas vezes com 500 µL de tampão PE e centrifugado a 13000 rpm por 30 segundo. Em seguida, deixou-se o tubo aberto por 15 minutos ou até que o precipitado secasse completamente. O DNA foi então eluído com 20 µL de água livre de nucleases e centrifugado por 30 segundos a 13000 rpm. O sobrenadante com o DNA foi removido cuidadosamente e transferido para um tubo limpo.

4.13. Clonagem do fragmento amplificado

Uma vez que o fragmento de cDNA obtido por RT-PCR, corresponda ao tamanho esperado de acordo com os *primers* utilizados, o seqüenciamento deste se faz necessário para confirmar sua identidade. O produto de PCR contendo o cDNA a ser identificado foi ligado a um plasmídio vetor pGEM-T Easy (Vector System I, PROMEGA contendo um gene de resistência a ampicilina) através de uma enzima ligase. A ligação ocorreu a temperatura ambiente por 2 horas, em uma relação de aproximadamente três moléculas do fragmento de cDNA para uma molécula do vetor. Para se obter uma quantidade suficientemente grande para realizar o seqüenciamento, o vetor com o fragmento de interesse foi replicado em uma bactéria hospedeira, *Escherichia coli* – JM 109. O produto de ligação foi incorporado em *E. coli* JM 109 por choque térmico (transformação) e estas foram em seguida deixadas em meio de cultura LB-ágar contendo carbenicilina a 37 °C, durante toda a noite. Dois tipos de bactérias transformadas foram assim formados, um contendo o pGEM-T Easy vazio, e outro com o vetor contendo o fragmento de cDNA de interesse. Os plasmídios que continham o fragmento de interesse foram isolados das colônias positivas e então purificados através de uma Mini-Preparação. Os plasmídeos purificados foram então enviados para Departamento. de Genética/IB-UNESP para serem sequenciados.

4.14. Preparação de bactérias JM 109 competentes

As células de *E. coli* JM 109 competentes conservadas em glicerol 15% à -80°C foram descongeladas e uma pequena fração foi colocada em cultura num tubo de ensaio com 2 mL de LB líquido, sob agitação de 145 rpm, à 37°C e durante uma noite em incubadora de bancada CT712 CIENTEC. No dia seguinte, os 2 mL de cultura foram versados num erlenmeyer contendo 10 mL de LB líquido e incubados nas mesmas condições anteriores, durante aproximadamente 3 horas. Em seguida, a cultura de bactérias foi dividida em dois tubos eppendorf e centrifugada por 2 minutos à 5000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, cada precipitado ressuspensão em 500 μL de solução I (MOPs 10 mM, KCL 10 mM) e em seguida centrifugado por 2 minutos à 5000 rpm à temperatura ambiente. O precipitado foi recuperado e a ele adicionado 500 μL de solução II (MOPs 100 mM, KCl 10 mM, CaCl_2 50 mM) e colocado no gelo por 15 minutos. Após esse tempo foi feita mais uma centrifugação de 2 minutos à 5000 rpm à temperatura ambiente. Ao precipitado foram adicionados 100 μL de solução II mais o DNA de ligação (5 μL) e deixado no gelo por aproximadamente 1 hora. Posteriormente colocou-se os tubos eppendorf contendo as bactérias com o DNA de ligação à 42°C por 1 minuto, em seguida adicionou-se 1 mL de LB e deixou-se em banho-maria à 37°C por 1 hora. Foi então feita mais uma centrifugação de 2 minutos à 5000 rpm à temperatura ambiente e o precipitado foi ressuspensão em 100 μL de LB. A cultura restante foi então semeada em placas de petri com LB Agar com ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IPTG 0,5 M e X-gal 2% sendo, em seguida, incubadas em estufa à 37°C por uma noite.

4.15. Seleção de colônias transformadas

Para avaliar que colônias haviam sido transformadas com os genes utilizados na transformação, fez-se uma PCR usando os mesmos *primers* utilizados a partir de uma pequena amostra de cada colônia, obtida pelo toque com um palito. Dentre as colônias que apresentaram a amplificação de uma banda de tamanho esperado de acordo com o gene, escolheu-se uma para fazer a mini-preparação do plasmídio.

4.16. Mini-preparação do plasmídio

Uma colônia de *E. coli* JM 109 isolada, previamente avaliada por PCR, foi coletada com um toque de um palito estéril, adicionada a um erlenmeyer contendo 10 mL de meio terrific broth contendo ampicilina 100 µg/µl e incubada à 37⁰C, sob agitação de 145 rpm em incubador de bancada toda a noite. Em seguida, 1,2 mL do meio foi centrifugado por 2 minutos à 5000 rpm à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso com 200 µL de solução I (25 mM de Tris pH 8,0 e 10 mM de EDTA), mais 300 µL de solução II (0,2 N de NaOH e SDS 2%), aguardou-se 5 minutos à temperatura ambiente e em seguida adicionou-se 300 µL de acetato de K⁺ 3 M pH 5,2. A mistura foi então centrifugada por 10 minutos à 13 000 rpm à temperatura ambiente. Em seguida foi realizado uma extração com fenol/clorofórmio 1:1 e mais uma vez centrifugado por 5 minutos à 13000 rpm. Recuperou-se o sobrenadante, adicionou-se igual volume de isopropanol 100% gelado e centrifugou-se a 13200 rpm por 5 minutos. O precipitado foi então lavado com 500 µL de etano 80%, centrifugado por 5 minutos à 13200 rpm. O etanol foi descartado e o precipitado ressuspenso em água livre de RNA e incubado à 37⁰C por 20 minutos. Em seguida adicionou-se 8 µL de NaCl 4M e 40 µL de PEG 8000 13% e deixou-se no gelo por 20 minutos e posteriormente centrifugou-se por 15 minutos à 11500 rpm à 4⁰C. O precipitado foi então lavado com 500 µL de etano 80% frio, mais uma vez centrifugado por 5 minutos à 13200 rpm. O etanol foi então descartado, e ao tubo sem o menor vestígio de álcool e contendo o DNA plasmídico foram adicionados 20 µL de água estéril (Milli-Q autoclavada).

4.17. Digestão do plasmídio pGEM-T Easy por enzimas de restrição

O plasmídio pGEM-T isolado dos diferentes clones foi digerido com a enzima *EcoRI* para liberar os insertos durante 3 horas a 37⁰C em eppendorf contendo:

Digestão:

DNA plasmídico (mini-prep) -----1 µL

Tampão 10X H -----1 µL

H₂O estéril ----- 6 µL

EcoRI (xU/µL)-----1 µL

Após a digestão, 1 µL de azul de bromofenol (azul de bromofenol 0,04%, glicerol 50%) foi adicionado ao volume de 5 µL do meio de reação e em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0% e tampão TBE 1X. A eletroforese foi realizada em aparelho indicado no item 3.10 com amperagem constante 50 mA por aproximadamente 30 minutos à temperatura de 25⁰ C.

4.18. Sequenciamento e comparação de seqüências

O sequenciamento dos clones dos cDNAs do contra-transportador vacuolar (NHX) foi feito Depto. de Genética/IB-UNESP a partir de 10 µg de plasmídio pGEM-T Easy purificado (mini-preparação) utilizando os *primers* universais M13 senso e anti-senso. As seqüências nucleotídicas parciais foram alinhadas e comparadas utilizando o programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994).

4.19. Análise de Bioinformática dos genes das bombas de prótons (*VuVHA-A*, *VuHVP*) e dos contra-transportadores vacuolares (*VuNHX1*, *VuNHX2*, *VuNHX3* e *VuNHX4*).

4.19.1 BLAST

Com o uso de ferramenta de NCBI “Basic Local Alignment Search Tool”, ferramenta de alinhamento básico local (BLAST), que faz uso de algoritmos e matrizes matemáticas para pesquisar e alinhar similaridades entre seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos foram feitas buscas sucessivas no banco de genes.

4.19.2 ClustalW2

ClustalW2 é um programa geral com vários propósitos que alinha múltiplas sequências divergentes levando a resultados com significância biológica. Este programa encontra-se disponível para uso on line e é capaz de calcular o melhor alinhamento, a identidade, e as similaridades e as diferenças entre sequências de DNA ou de proteínas e está na versão 2 (LARKIN et al., 2007). Esta ferramenta foi usada para todos os alinhamentos desenvolvidos e os cálculos de similaridade entre os genes das bombas de prótons e dos contra-transportadores vacuolares de *V. unguiculata*.

4.19.3 Relações Filogenéticas

Com base nos resultados obtidos através do alinhamento de sequências do gene do NHX de plantas pelo algoritmo do ClustalW2, entre elas *V. unguiculata*, *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* e *Populus trichocarpa*, foram feitas análises de filogenia usando-se o programa MEGA 4 (TAMURA et al., 2007).

Foi usado o programa MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) através do método estatístico de “Bootstrap”, um teste comum usado em análises filogenéticas, para estimar os ramos de uma árvore, tendo como padrão o algoritmo de “Neighbour-joining”, baseado nas sequências de proteína ou de DNA e conhecimento das distâncias entre os taxa, possibilitando o desenho de árvores evolutivas (TAMURA et al., 2007).

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros de Crescimento:

O desenvolvimento de plantas de *Vigna unguiculata* cv. Vita 5 submetidas a 100 mM de NaCl por 6, 12 e 24 horas foi avaliado através da medida do peso fresco das raízes, dos hipocótilos e das folhas das plântulas (Figura 6). O peso fresco das raízes aumentou 38% com 6 horas de tratamento com NaCl 100 mM e diminuiu 24% após 12 horas de aplicação do estresse. O peso fresco dos hipocótilos diminuiu com 12 horas de tratamento com o NaCl 100 mM. As folhas apresentaram uma diminuição do peso fresco com 6 e 12 horas de 34 e 23,2% respectivamente, após a exposição ao estresse salino e nenhum dos tecidos estudados apresentou diferença de peso fresco com 24 horas de exposição ao estresse salino.

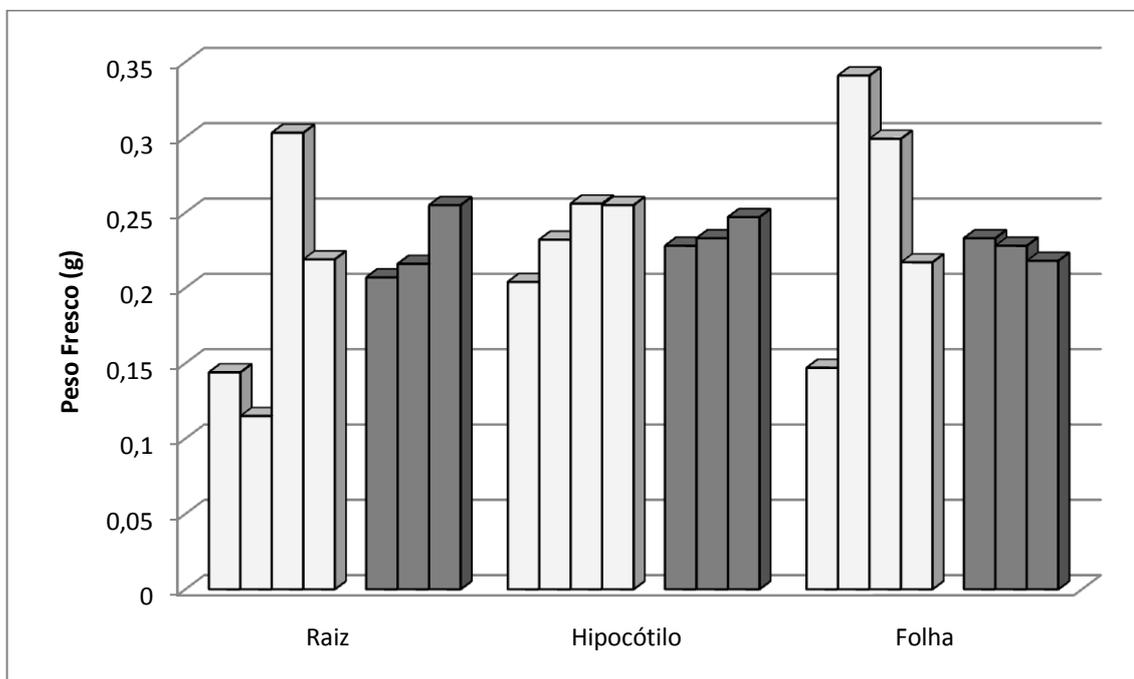


Figura 6. Análise do peso fresco de raízes, hipocótilos e folhas de plântulas de *V. unguiculata* cv. Vita 5 crescidas em solução nutritiva na ausência de NaCl 100 mM (C) e na presença de NaCl 100 mM (S) com 6, 12 e 24 horas.

5.2. Conteúdo de Na⁺ e K⁺ em plântulas de *Vigna unguiculata*

O conteúdo de íons Na⁺ e K⁺ em raízes, hipocótilos e folhas de *V. unguiculata* cv. Vita 5 foi avaliado com 6, 12 e 24 horas de tratamento com 100 mM de NaCl em solução nutritiva. O conteúdo de Na⁺ aumentou após a adição do NaCl 100 mM em todos os tecidos analisados e o conteúdo de K⁺ em geral foi menor na condição de estresse salino quando comparado ao controle também em todos os tecidos analisados (Figuras 7, 8 e 9). Nas raízes o conteúdo de Na⁺ aumentou 240, 340 e 207% com 6, 12 e 24 horas respectivamente. O conteúdo de K⁺ foi menor 4 e 15% com 6 e 24 horas e maior 4,5% com 12 horas de estresse salino (Figura 7). Nos hipocótilos o aumento do conteúdo de Na⁺ foi 166,6, 255,5 e 208,3% com 6, 12 e 24 horas de exposição ao estresse salino respectivamente, contudo, o conteúdo de K⁺ diminuiu 18 e 20% com 6 e 24 horas de exposição ao estresse salino, respectivamente, e aumentou 18,5% com 12 horas de estresse (Figura 8). Nas folhas, o conteúdo de Na⁺ aumentou 125% após 6 e 24 horas de estresse salino quando comparado aos controles enquanto que, com 12 horas de estresse houve uma diminuição de 15% em relação ao controle. Já o conteúdo de K⁺ nas folhas aumento 7,4% com 6 horas de estresse salino e diminuiu 10 e 19% com 12 e 24 horas, respectivamente, de exposição ao NaCl (Figura 9).

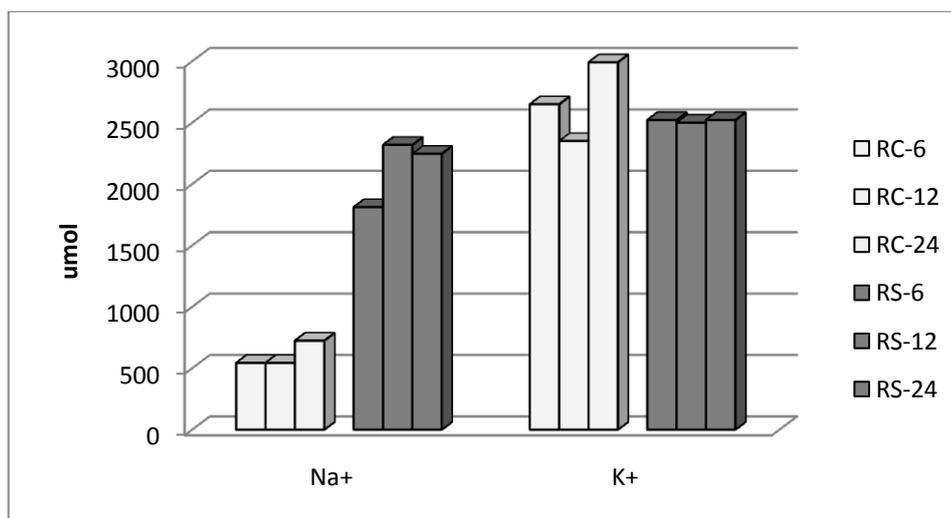


Figura 7. Conteúdo de Na⁺ e K⁺ em raízes de *V. unguiculata* crescidas em solução nutritiva e analisado em fotômetro de chama após 6, 12 e 24 horas de exposição ao NaCl 100 mM. RC, indica raiz em condição controle e RS, indica raiz em condição de estresse com NaCl 100 mM.

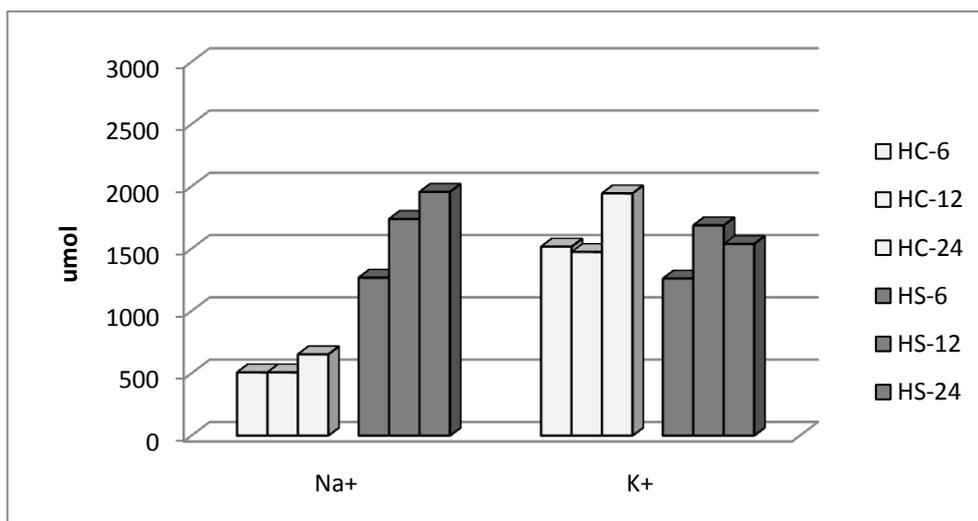


Figura 8. Conteúdo de Na⁺ e K⁺ em hipocótilos de *V. unguiculata* crescidas em solução nutritiva e analisado em fotômetro de chama após 6, 12 e 24 horas de exposição ao NaCl 100 mM. HC, indica hipocótilo em condição controle e HS, indica hipocótilo em condição de estresse com NaCl 100 mM.

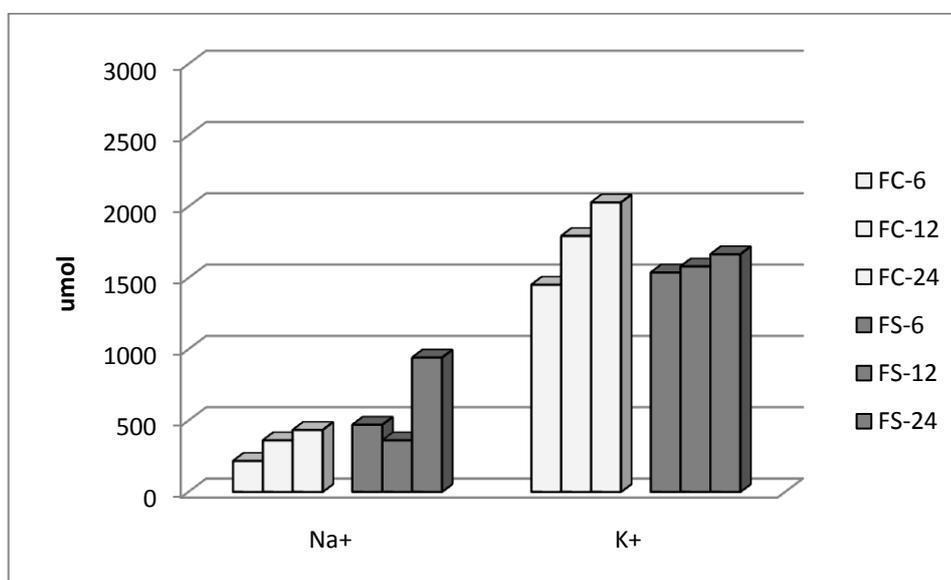


Figura 9. Conteúdo de Na⁺ e K⁺ em folhas de *V. unguiculata* crescidas em solução nutritiva e analisado em fotômetro de chama após 6, 12 e 24 horas de exposição ao NaCl 100 mM. FC, indica folha em condição controle e FS, indica folha em condição de estresse com NaCl 100 mM.

A relação K⁺/Na⁺ foi calculada a partir dos valores das concentrações dos íons K⁺ e Na⁺ nas raízes, nos hipocótilos e nas folhas de plantas de *V. unguiculata* cultivar Vita 5, em condição controle e de estresse salino e os resultados estão mostrados na tabela 4. A relação K⁺/Na⁺ diminuiu em resposta ao estresse salino em todos os tecidos analisados (Tabela 4). Nas raízes foram observados diminuições de 3,5, 4 e 3,7 vezes com 6, 12 e 24

horas de estresse salino, respectivamente. Nos hipocótilos foram observados diminuições de 3 vezes com 6 e 12 horas, respectivamente e 3,8 vezes com 24 horas de estresse salino. Já em folhas a queda foi de 2, 1 e 2,6 vezes com 6, 12 e 24 horas de estresse salino respectivamente.

Tabela 4. Relação K^+/Na^+ em raízes, hipocótilos e folhas de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv. Vita 5, com 6, 12 e 24 horas sob condição controle e de estresse salino.

	Relação K^+/Na^+		
	Raiz	Hipocótilo	Folha
C-6h	4,87	2,99	6,68
C-12h	4,32	2,90	4,95
C-24h	4,12	2,98	4,66
S-6h	1,39	0,99	3,26
S-12h	1,07	0,97	4,36
S-24h	1,12	0,78	1,76

5.3. Análise da expressão de mRNA das bombas de prótons (V-ATPase e da V-PPase) e dos contra-transportadores vacuolares (NHX) de plântulas de *Vigna unguiculata* submetidas a estresse salino e estresse osmótico.

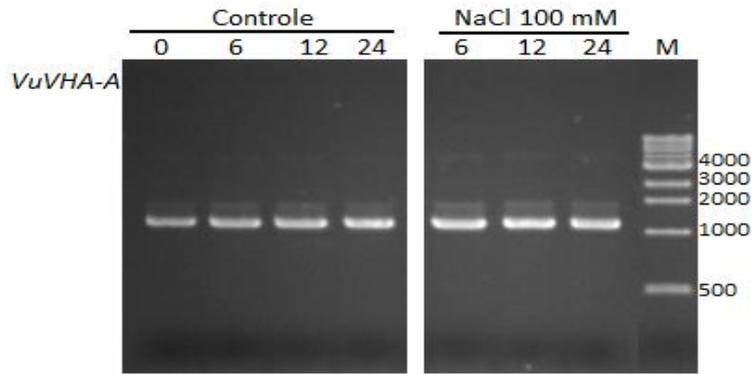
A quantificação dos transcritos dos genes da V-ATPase, da V-PPase e dos NHX foi avaliada através da amplificação por PCR do cDNA dessas enzimas, utilizando a técnica de RT-PCR.

5.3.1. Avaliação da expressão do gene da subunidade A da V-ATPase (*VuVHA-A*) em folhas e raízes de *V. unguiculata* submetidas a estresse salino

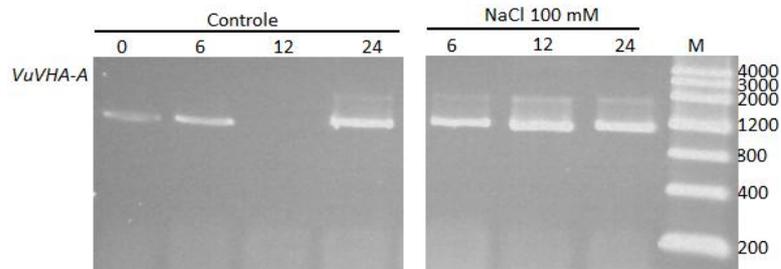
O nível de transcritos da subunidade A da V-ATPase (*VHA-A*) foi avaliado em folhas e raízes de *V. unguiculata* cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura das plantas e com 6, 12 e 24 horas de exposição ao NaCl 100 mM (Figuras 10A, B e C). A expressão do *VuVHA-A* das folhas das plântulas com 7 dias de semeadura aumentou 44,8% com 6 horas e diminuiu 4% e 26% com 12 e 24 horas respectivamente em condição de estresse salino quando comparado aos controles (Figura 10A e C), enquanto que nas raízes a expressão do *VuVHA-A* aumentou 54,5, e 5,2 com 6, e 24 horas respectivamente em condição de estresse salino quando

comparado aos controles (Figura 10B e C). Em raízes de plantas controle com 12 horas não foi observado expressão do gene *VuVHA-A* entretanto, em condição de estresse salino uma elevada expressão desse gene foi detectada (Figura 10B e C).

A



B



C

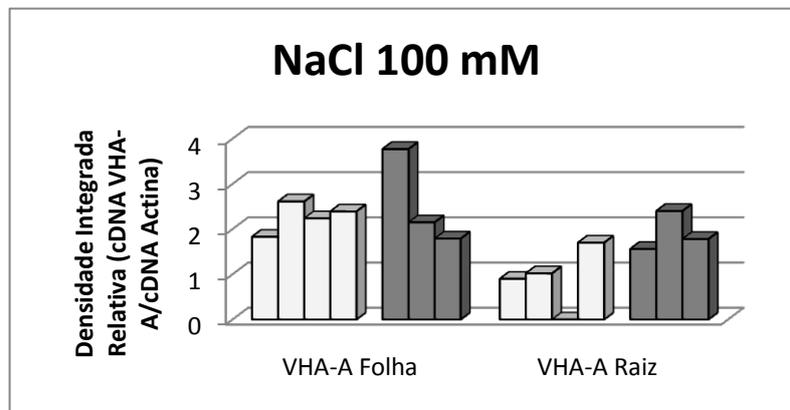


Figura 10. Expressão do gene *VuVHA-A* de folhas (A) e raízes (B) de *V. unguiculata* com 6, 12 e 24 horas de estresse salino (NaCl 100 mM) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da *VuVHA-A* obtidos por análise de densitometria. As barras brancas correspondem aos controles 0, 6, 12 e 24 horas e as barras escuras correspondem ao estresse salino 6, 12 e 24 horas.

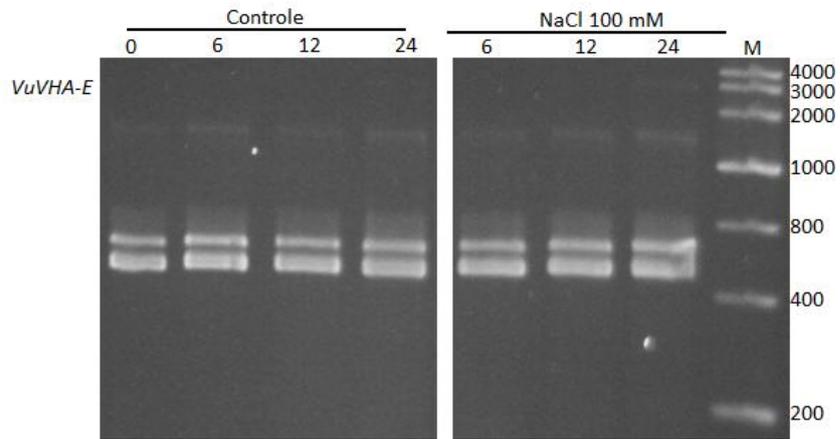
5.3.2. Avaliação da expressão do gene da subunidade E da V-ATPase (*VuVHA-E*) em folhas e raízes submetidas a estresse salino

A subunidade E da V-ATPase apresenta três isoformas com diferentes pesos moleculares (E1, E2 e E3). O nível de transcritos de duas isoformas (E2 e E3) da subunidade E da V-ATPase (*VHA-E*) foi avaliado em folhas e raízes de *V. unguiculata* cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura das plantas com 6, 12 e 24 horas de exposição ao NaCl 100 mM (Figuras 11A, B e C). A expressão do *VuVHA-E2* das folhas das plântulas com 7 dias de semeadura diminuiu 40, 32 e 6% com 6, 12 e 24 horas de estresse salino respectivamente quando comparados ao controle (Figuras 11A e C). Em raiz, a expressão do *VuVHA-E2* aumentou 20% e 16,6% com 6 e 24 horas de estresse salino respectivamente e diminuiu 40% após 12 horas de estresse salino quando comparado ao controle (Figuras 11B e C). A expressão do *VuVHA-E3* de folhas diminuiu 36, 28 e 30 com 6, 12 e 24 horas de estresse salino respectivamente quando comparados ao controle (Figuras 11A e C) e nas raízes houve um aumento da expressão do *VuVHA-E3* de 27,7% com 6 horas de estresse salino e diminuição de 45% com 12 horas e com 24 horas de estresse salino não houve mudança significativa (Figuras 11B e C).

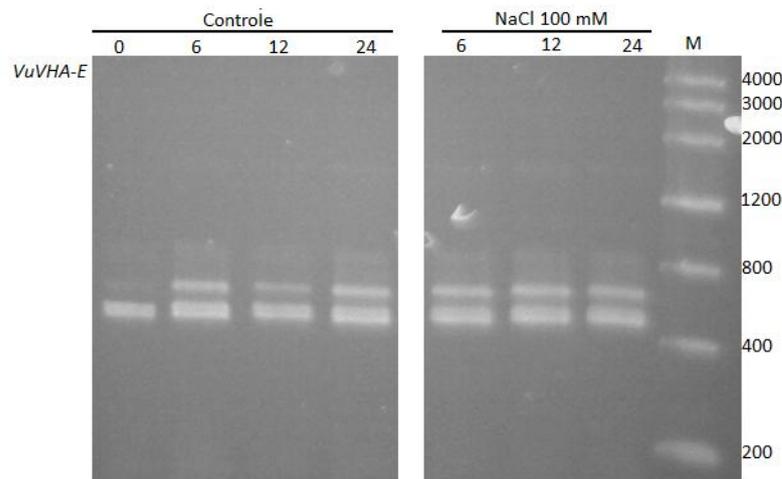
5.3.3. Avaliação da expressão do gene da V-PPase (*VuHVP*) em folhas e raízes de *V. unguiculata* submetidas a estresse salino

O nível de transcritos da V-PPase (*VuHVP*) foi avaliado em folhas e raízes de *V. unguiculata* cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura das plantas e 6, 12 e 24 horas após a aplicação do NaCl 100 mM (Figuras 12A, B e C). A expressão do *VuHVP* das folhas das plântulas com 7 dias de semeadura aumentou 66,6 e 7,14% com 6 horas e 12 horas, respectivamente e diminuiu 27% com 24 horas em condição de estresse salino quando comparado aos controles (Figuras 12A e C). Nas raízes a expressão do *VuHVP* aumentou 33,3 com 6 horas e diminuiu 23% com 24 horas em condição de estresse salino quando comparado aos controles. Em raízes de plantas controle com 12 horas não foi observado expressão do gene *VuHVP* entretanto, em condição de estresse salino uma elevada expressão desse gene foi detectada (Figura 12B e C).

A



B



C

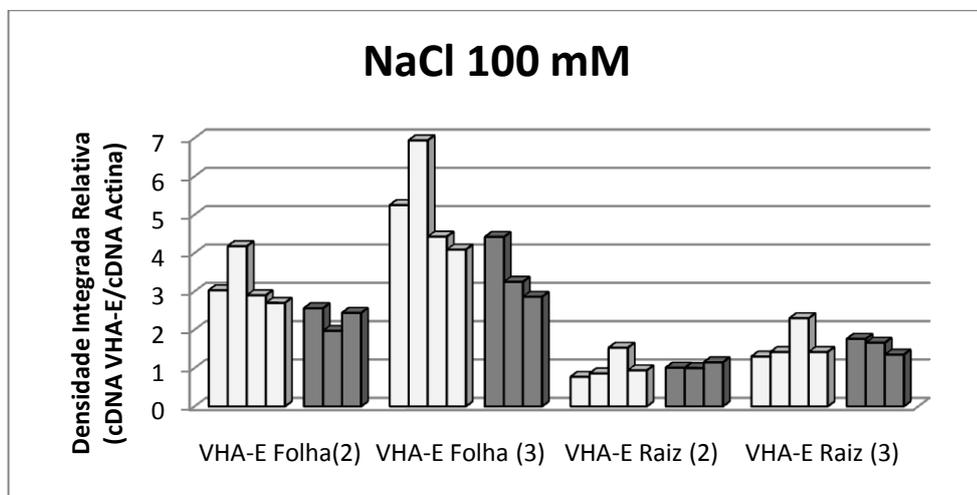
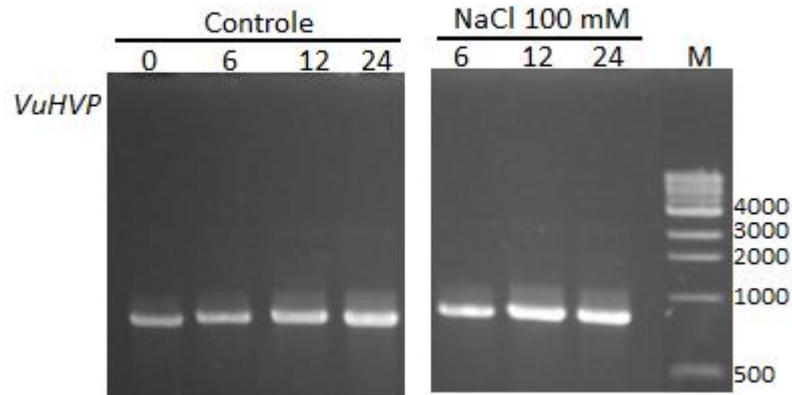
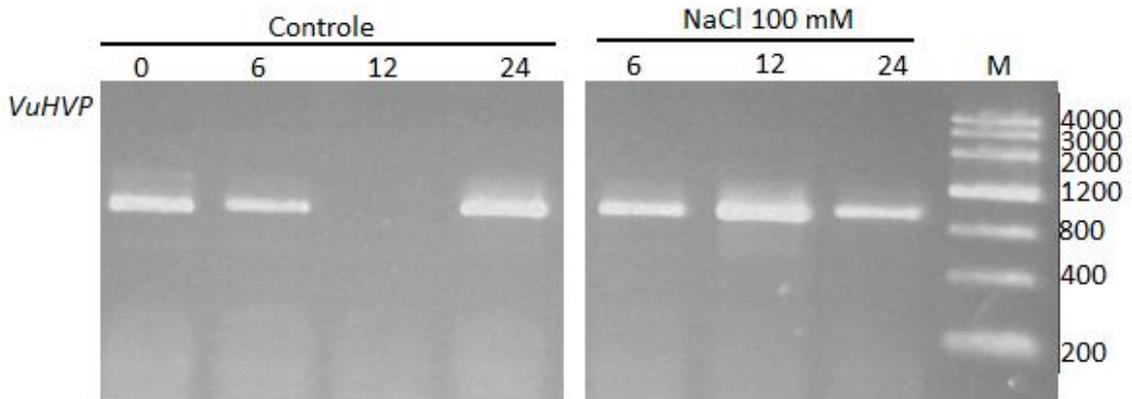


Figura 11. Expressão do gene *VuVHA-E* de folhas (A) e raízes (B) de *V. unguiculata* com 6, 12 e 24 horas de estresse salino (NaCl 100 mM) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da *VuVHA-E* obtidos por análise de densitometria. As barras brancas correspondem aos controles 0, 6, 12 e 24 horas e as barras escuras correspondem ao estresse salino 6, 12 e 24 horas.

A



B



C

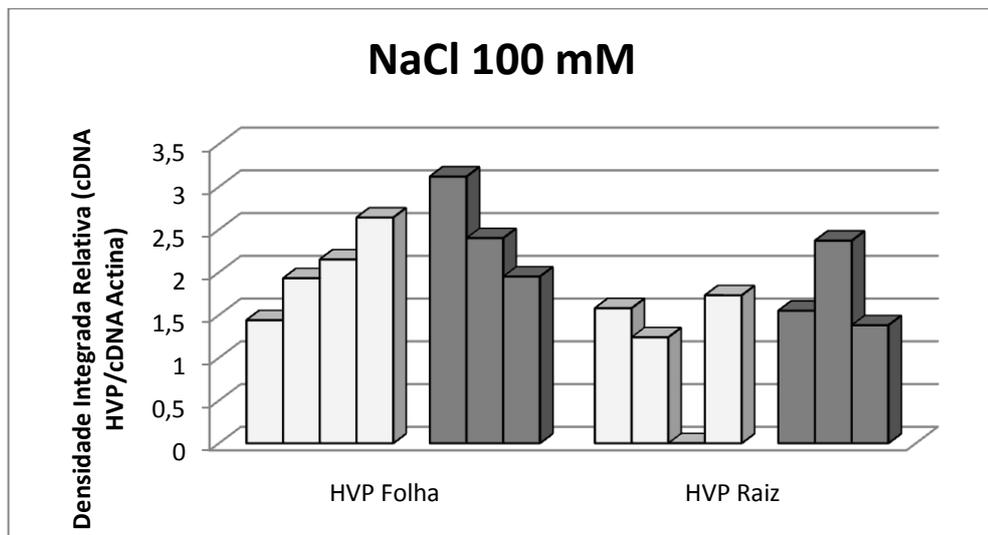


Figura 12. Expressão do gene *VuHVP* de folhas (A) e raízes (B) de *V. unguiculata* com 6, 12 e 24 horas de estresse salino (NaCl 100 mM) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da *VuHVP* obtidos por análise de densitometria. As barras brancas correspondem aos controles 0, 6, 12 e 24 horas e as barras escuras correspondem ao estresse salino 6, 12 e 24 horas.

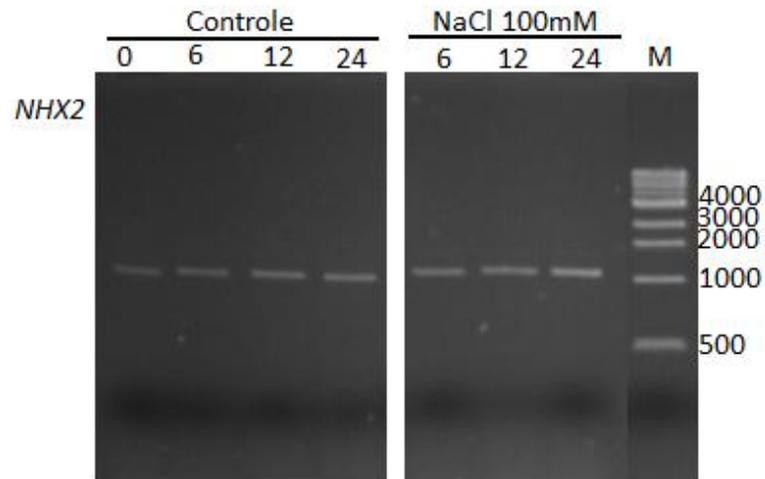
5.3.4. Avaliação da expressão do gene *VuNHX2* em folhas e raízes de *V. unguiculata* submetidas a estresse salino

O nível de transcritos do contra-transportador vacuolar (*VuNHX2*) foi avaliado em folhas e raízes de *V. unguiculata* cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura das plantas e 6, 12 e 24 horas após a aplicação do estresse salino (NaCl 100 mM) (Figuras 13A, B e C). A expressão do *VuNHX2* das folhas das plântulas com 7 dias de semeadura aumentou 37,5, 50 e 27,2% com 6, 12 e 24 horas de exposição ao NaCl 100 mM respectivamente (Figuras 13A e C). Em raízes, a expressão do *VuNHX2* aumentou com 6 e 24 horas de estresse salino o equivalente a 72,7, e 44,7% respectivamente. Em raízes de plantas controle com 12 horas não foi observado expressão do gene *VuNHX2* entretanto, em condição de estresse salino uma elevada expressão desse gene foi detectada (Figura 13B e C).

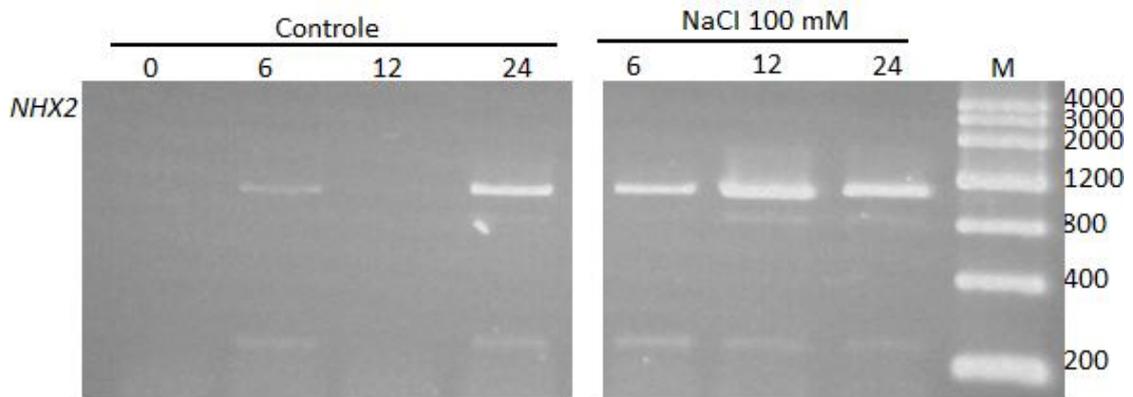
5.3.5. Avaliação da expressão do gene *VuNHX6* em folhas e raízes submetidas a estresse salino

O nível de transcritos do contra-transportador vacuolar (*VuNHX6*) foi avaliado em folhas e raízes de *V. unguiculata* cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura das plantas e 6, 12 e 24 horas após a aplicação do estresse salino (NaCl 100 mM) (Figuras 14A, B e C). A expressão do *VuNHX6* das folhas das plântulas com 7 dias de semeadura aumentou 70, 60 e 150 % após 6, 12 e 24 horas respectivamente após exposição ao NaCl 100 mM (Figuras 14A e C). Em raízes, a expressão do *VuNHX6* também aumentou com 6, 12 e 24 horas de estresse salino o equivalente a 31,9, 17,6 e 13,7% respectivamente (Figuras 14B e 14C).

A



B



C

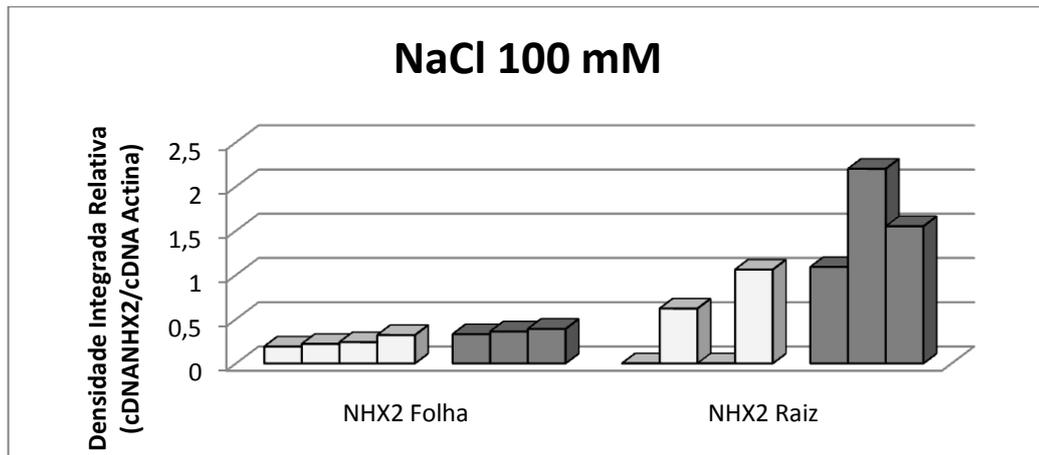
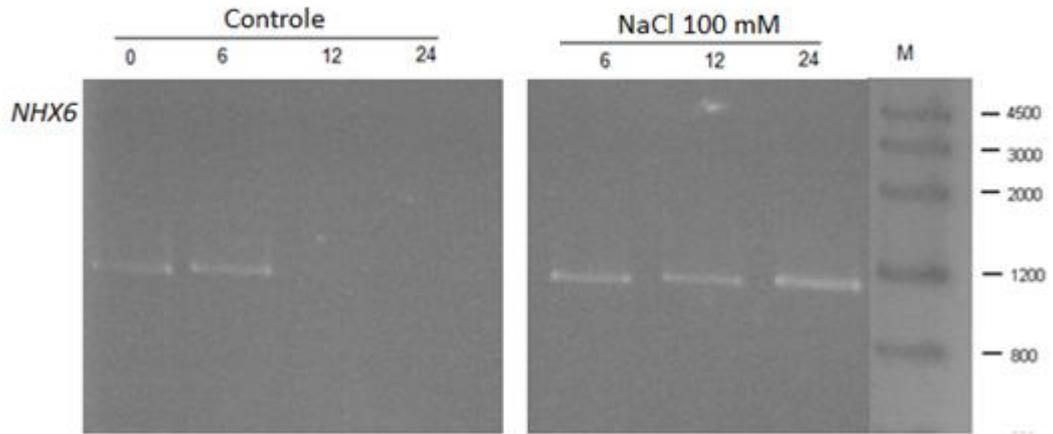
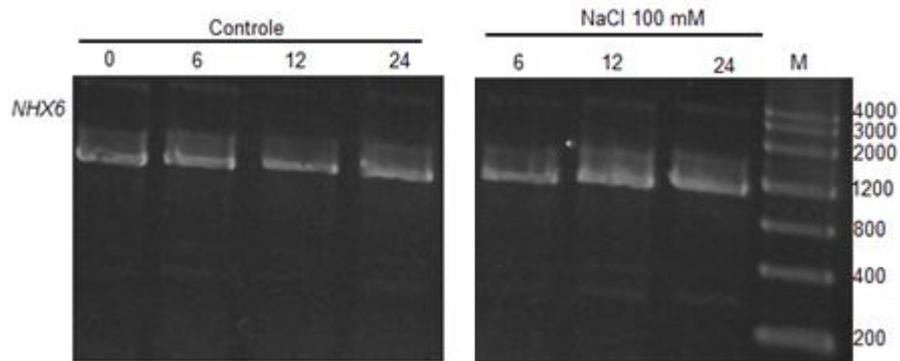


Figura 13. Expressão do gene *VuNHX2* de folhas (A) e raízes (B) de *V. unguiculata* com 6, 12 e 24 horas de estresse salino (NaCl 100 mM) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da *VuNHX2* obtidos por análise de densitometria. As barras brancas correspondem aos controles 0, 6, 12 e 24 horas e as barras escuras correspondem ao estresse salino 6, 12 e 24 horas.

A



B



C

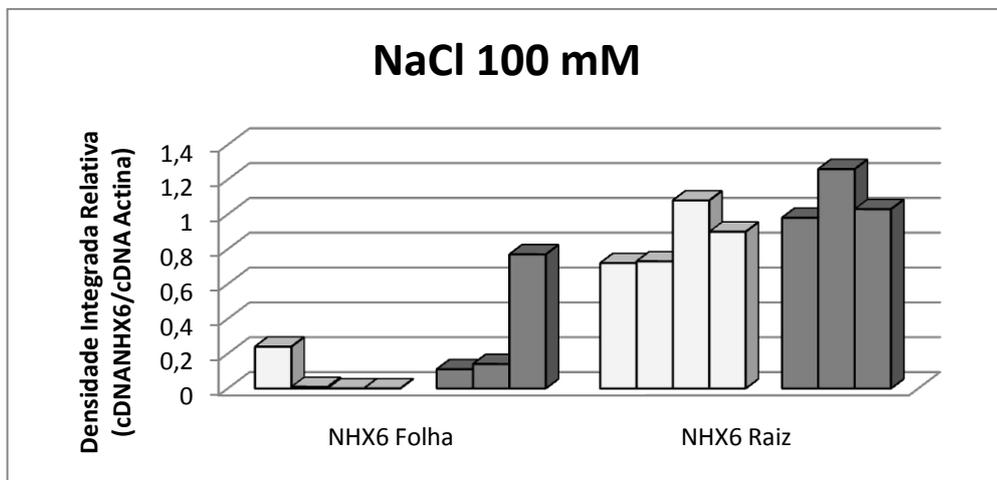


Figura 14. Expressão do gene *VuNHX6* de folhas (A) e raízes (B) de *V. unguiculata* com 6, 12 e 24 horas de estresse salino (NaCl 100 mM) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da *VuNHX6* obtidos por análise de densitometria. As barras brancas correspondem aos controles 0, 6, 12 e 24 horas e as barras escuras correspondem ao estresse salino 6, 12 e 24 horas.

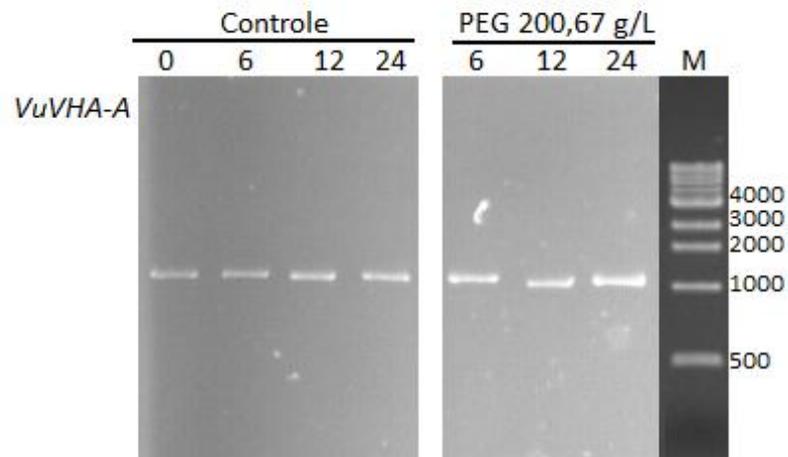
5.3.6. Avaliação da expressão do gene da subunidade A da V-ATPase (*VuVHA-A*) em folhas e raízes submetidas a estresse osmótico

O nível de transcritos da subunidade A da V-ATPase (*VHA-A*) foi avaliado em folhas e raízes de *V. unguiculata* cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura das plantas e 6, 12 e 24 horas após a aplicação do estresse osmótico (PEG 200,67 g/L) (Figuras 15A, B e C). A expressão do *VuVHA-A* das folhas aumentou 28,5, 25 e 44,4% com 6, 12 e 24 horas de estresse respectivamente quando comparado aos controles (Figura 15A e C). Em raízes após 6 horas de estresse osmótico houve uma diminuição da expressão do *VuVHA-A* de 23% em relação ao controle. Em plantas controle com 12 horas não foi observada expressão do gene *VuVHA-A* entretanto, em condição de estresse salino uma elevada expressão desse gene foi detectada, já com 24 horas não foi detectada expressão do gene na condição de estresse osmótico (Figuras 15B e C).

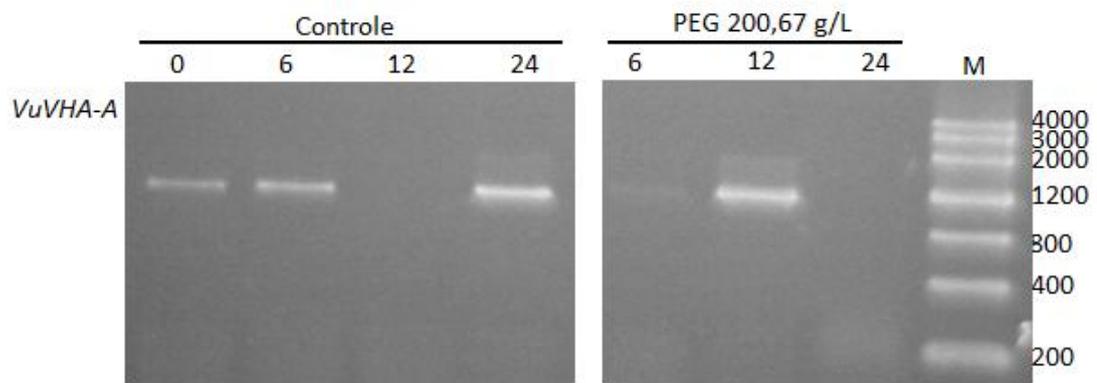
5.3.7. Avaliação da expressão do gene da subunidade E da V-ATPase (*VuVHA-E*) de folhas e raízes submetidas a estresse osmótico

O nível de transcritos de duas isoformas (E2 e E3) da subunidade E da V-ATPase (*VHA-E*) foi avaliado em folhas e raízes de *V. unguiculata* cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura das plantas e 6, 12 e 24 horas após a aplicação do PEG 200,67 g/L (Figuras 16A, B e C). A expressão do *VuVHA-E2* das folhas das plântulas com 7 dias de semeadura diminuiu 15, 8 e 24% com 6, 12 e 24 horas de exposição ao estresse osmótico respectivamente quando comparados ao controle. Em raiz, a expressão da *VuVHA-E2* aumentou 66,6 e 131% com 6 e 24 horas de exposição ao estresse osmótico respectivamente e diminuiu 40% com 12 horas de aplicação do estresse osmótico (Figuras 16B e C). A expressão da *VuVHA-E3* de folhas diminuiu 11 e 23% com 6 e 24 horas de estresse osmótico respectivamente quando comparados ao controle e aumentou 25% com 12 horas de estresse osmótico (Figuras 16A e C). Nas raízes houve um aumento da *VuVHA-E3* de 63,6% e 8,3% com 6 e 24 horas de estresse e uma diminuição de 32% com 12 horas de estresse osmótico quando comparado ao controle (Figuras 16B e C).

A



B



C

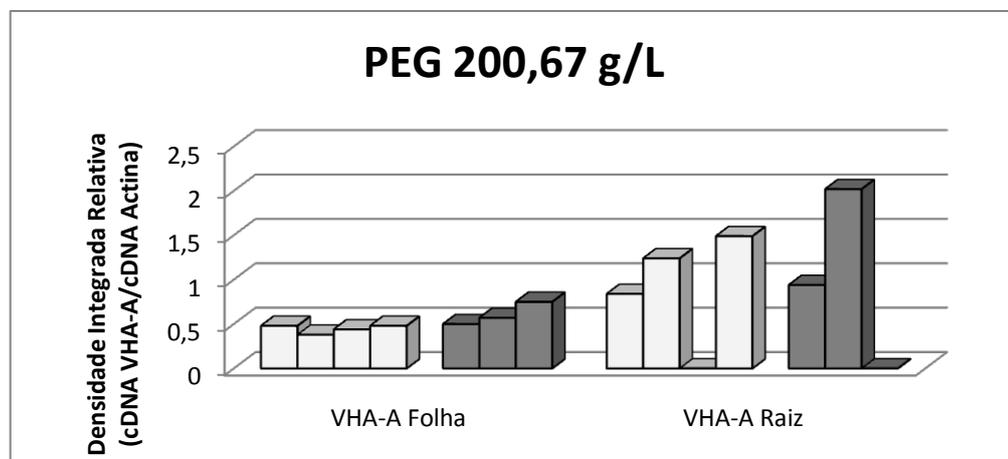
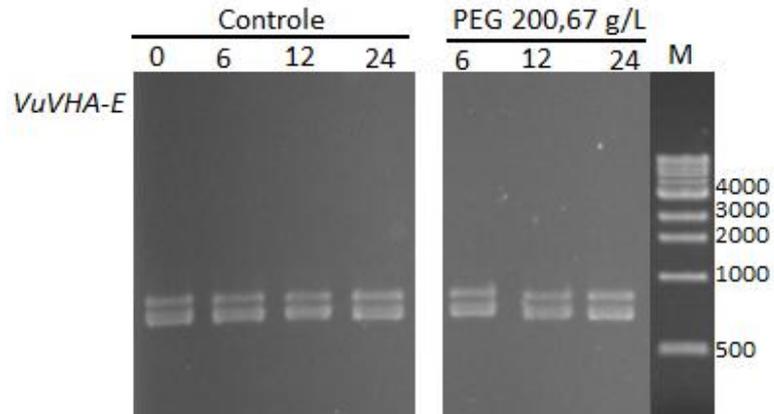
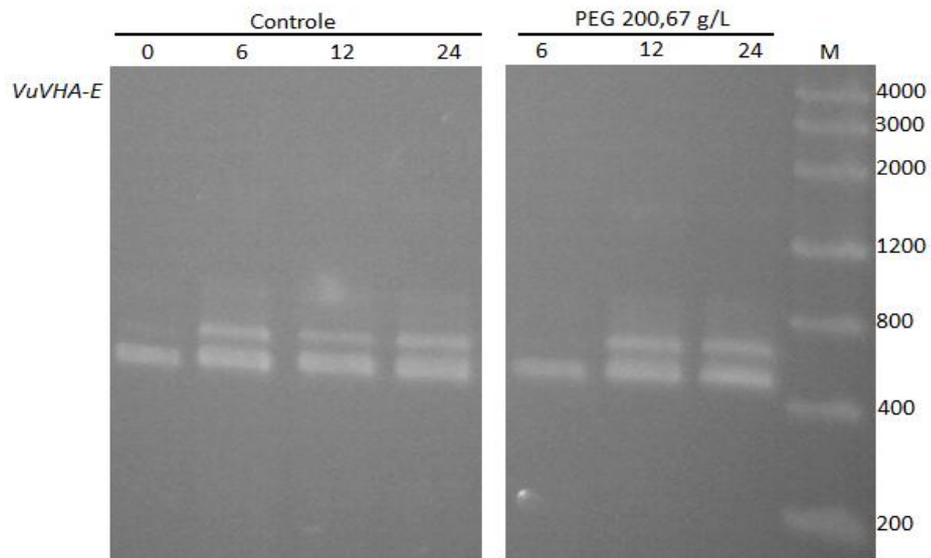


Figura 15. Expressão do gene *VuVHA-A* de folhas (A) e raízes (B) de *V. unguiculata* com 6, 12 e 24 horas de estresse osmótico (PEG 200,67g/L) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da *VuVHA-A* obtidos por análise de densitometria. As barras brancas correspondem aos controles 0, 6, 12 e 24 horas e as barras escuras correspondem ao estresse salino 6, 12 e 24 horas.

A



B



C

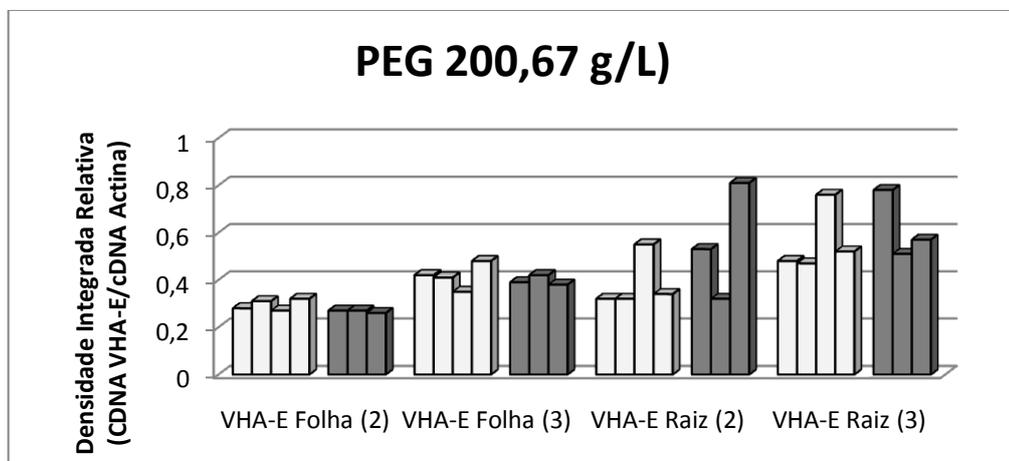


Figura 16. Expressão do gene *VuVHA-E* de folhas (A) e raízes (B) de *V. unguiculata* com 6, 12 e 24 horas de estresse osmótico (PEG 200,67g/L) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da *VuVHA-E* obtidos por análise de densitometria. As barras brancas correspondem aos controles 0, 6, 12 e 24 horas e as barras escuras correspondem ao estresse salino 6, 12 e 24 horas.

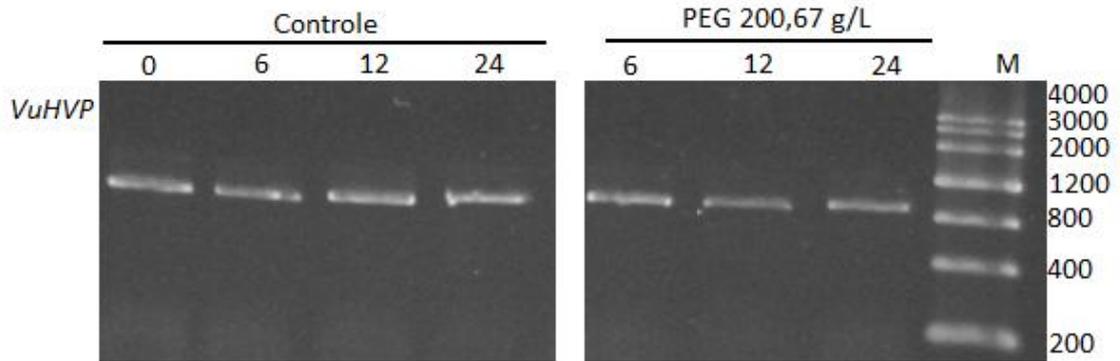
5.3.8. Avaliação da expressão do gene da V-PPase (*VuHVP*) em folhas e raízes de *V. unguiculata* submetidas a estresse osmótico

O nível de transcritos da V-PPase (*VuHVP*) foi avaliado em folhas e raízes de *V. unguiculata* cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura das plantas e 6, 12 e 24 horas após a aplicação do PEG 200,67 g/L (Figuras 17A, B e C). A expressão do *VuHVP* em folhas diminuiu 17, 31 e 20% com 6, 12 e 24 horas da aplicação do PEG respectivamente (Figuras 17A e C). Nas raízes a expressão do *VuHVP* aumentou 38,4% com 6 horas de exposição ao estresse osmótico, entretanto, a expressão do *VuHVP* com 24 horas diminuiu 7%. Em raízes de plantas controle com 12 horas não foi observado expressão do gene *VuHVP* entretanto, em condição de estresse salino uma elevada expressão desse gene foi detectada com (Figuras 17B e C).

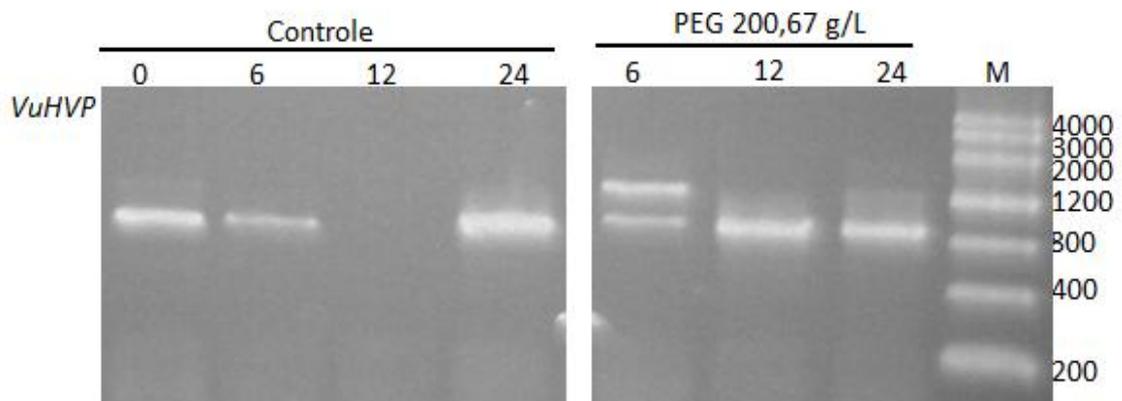
5.3.9. Avaliação da expressão do gene do contra-transportador vacuolar (*VuNHX2*) em folhas e raízes de *V. unguiculata* submetidas a estresse osmótico

O nível de transcritos do contra-transportador vacuolar (*VuNHX2*) foi avaliado em folhas e raízes de *V. unguiculata* cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura das plantas e 6, 12 e 24 horas após a aplicação do estresse osmótico (PEG 200,67 g/L) (Figuras 18A, B e C). Em folhas, após a exposição ao estresse osmótico observa-se que houve uma diminuição da expressão do *VuNHX2* com 6 horas de 24% e com 12 e 24 horas de tratamento osmótico a expressão aumentou 50% quando comparados aos controles (Figuras 18A e B). Em raízes a expressão do *VuNHX2* aumentou 85% com 24 horas do tratamento osmótico. Com 6 horas não foi observado expressão do *VuNHX2* na condição de estresse osmótico enquanto que com 12 horas não foi observado expressão do *VuNHX2* na condição controle. (Figuras 18B e C).

A



B



C

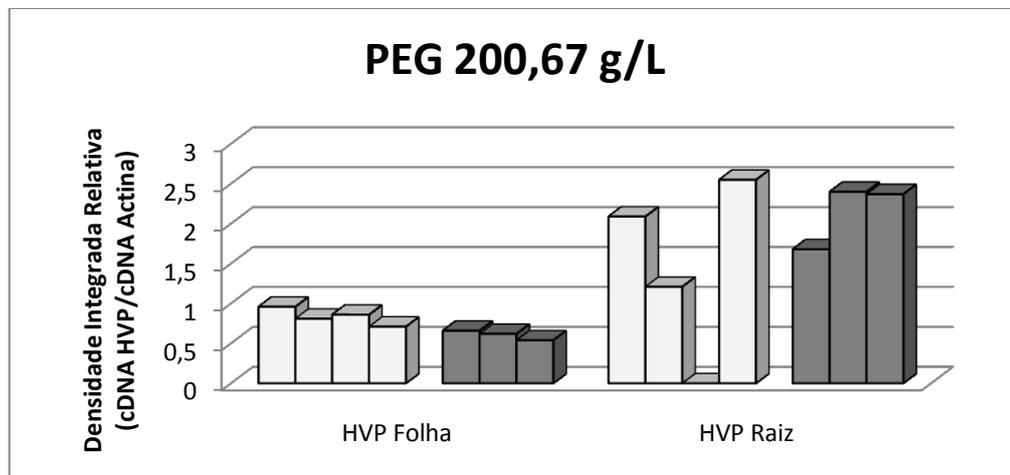
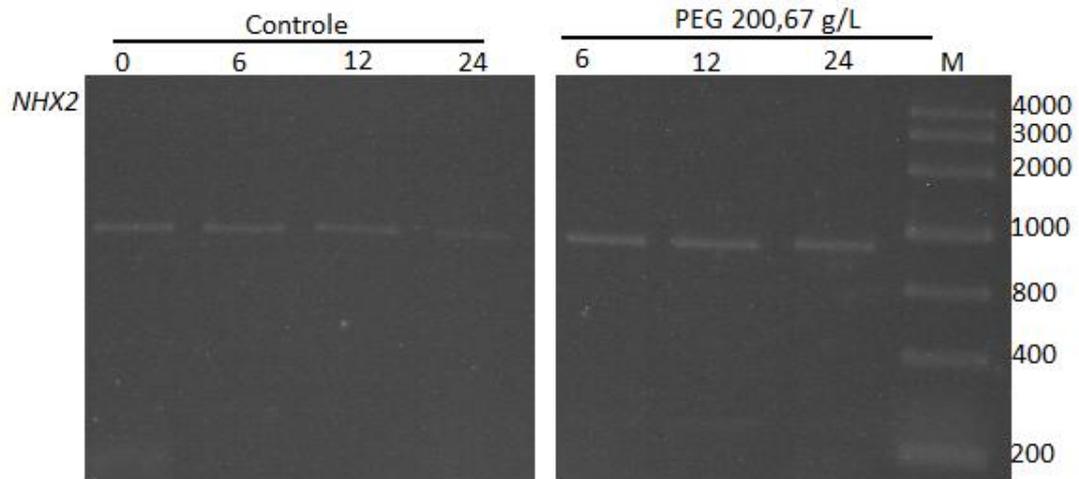
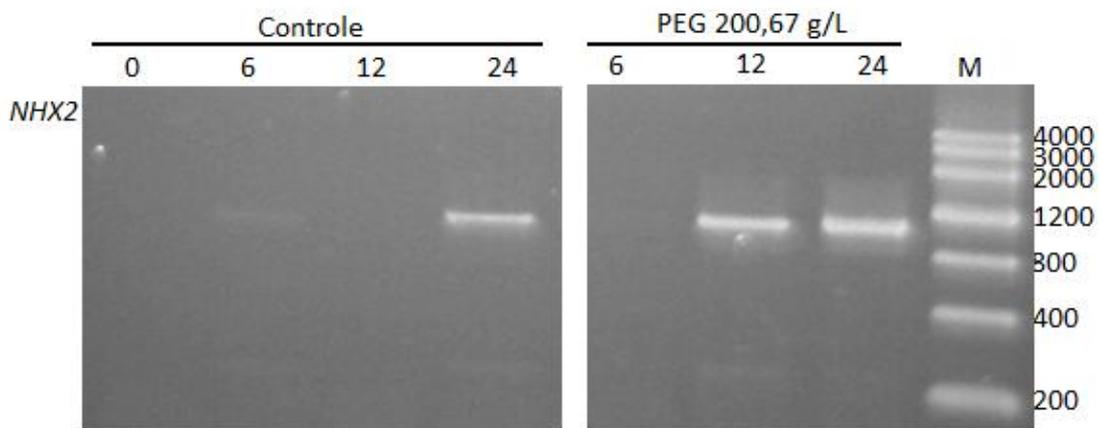


Figura 17. Expressão do gene *VuHVP* de folhas (A) e raízes (B) de *V. unguiculata* com 6, 12 e 24 horas de estresse osmótico (PEG 200,67g/L) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da *VuHVP* obtidos por análise de densitometria. As barras brancas correspondem aos controles 0, 6, 12 e 24 horas e as barras escuras correspondem ao estresse salino 6, 12 e 24 horas.

A



B



C

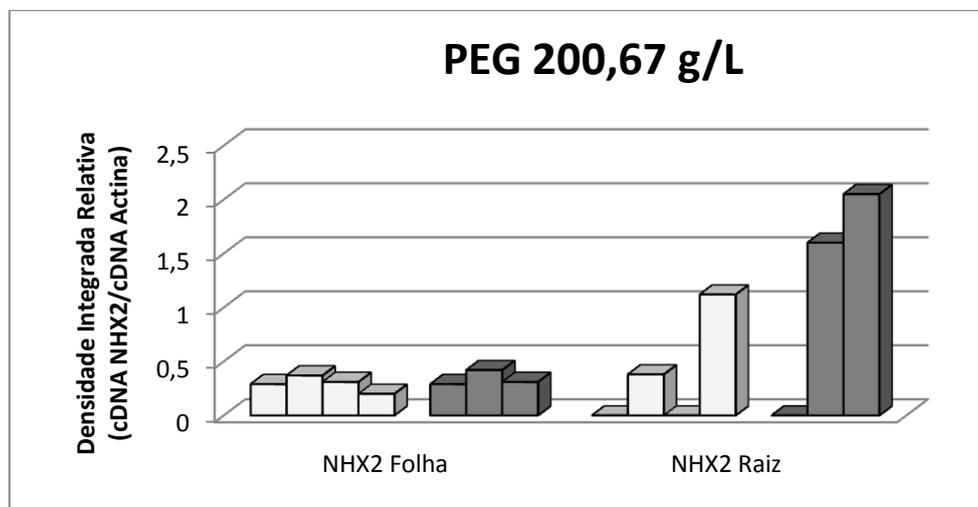
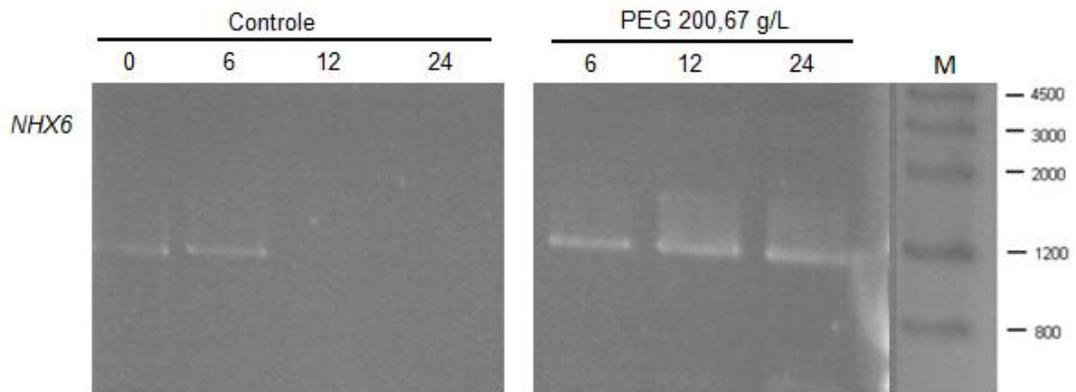


Figura 18. Expressão do gene *VuNHX2* de folhas (A) e raízes (B) de *V. unguiculata* com 6, 12 e 24 horas de estresse osmótico (PEG 200,67g/L) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da *VuNHX2* obtidos por análise de densitometria. As barras brancas correspondem aos controles 0, 6, 12 e 24 horas e as barras escuras correspondem ao estresse salino 6, 12 e 24 horas.

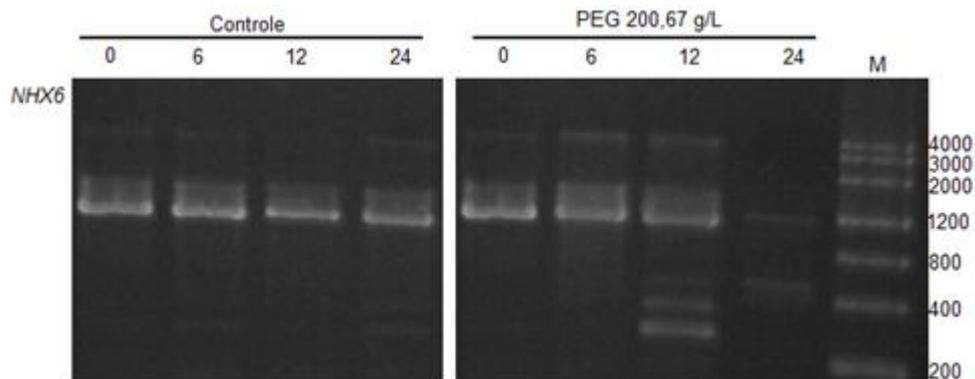
5.3.10. Avaliação da expressão do gene do contra-transportador vacuolar (*VuNHX6*) em folhas e raízes de *V. unguiculata* submetidas a estresse osmótico

O nível de transcritos do contra-transportador vacuolar (*VuNHX6*) foi avaliado em folhas e raízes de *V. unguiculata* cv. Vita 5 após 7 dias de semeadura das plantas e 6, 12 e 24 horas após a aplicação do PEG 200,67 g/L (Figuras 19A, B e C). A análise da expressão do gene NHX6 de folhas submetidas a estresse osmótico mostra que na condição controle praticamente não houve alteração no padrão de expressão enquanto que, um aumento de na expressão foi observado com 6, 12 e 24 horas de aplicação do PEG é observado (Figuras 19A e C). Nas raízes a expressão do *VuNHX6* aumentou 66,6% com 6 horas de estresse com o PEG e diminuiu 35 e 58% com 12 e 24 horas de estresse respectivamente (Figuras 19B e 19C).

A



B



C

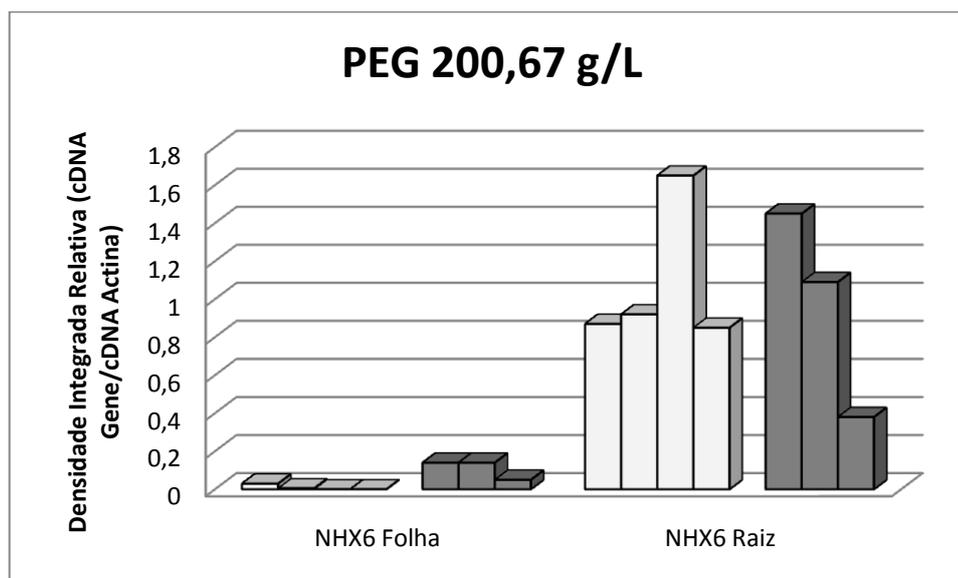


Figura 19. Expressão do gene *VuNHX6* de folhas (A) e raízes (B) de *V. unguiculata* com 6, 12 e 24 horas de estresse osmótico (PEG 200,67g/L) obtida através de RT-PCR. (C) Quantificação do teor de transcritos da *VuNHX6* obtidos por análise de densitometria. As barras brancas correspondem aos controles 0, 6, 12 e 24 horas e as barras escuras correspondem ao estresse salino, 6, 12 e 24 horas.

5.4 Sequenciamento dos clones de cDNA da ATPase vacuolar de *Vigna unguiculata*

A partir de RNA de hipocótilos de *V. unguiculata* em condição de estresse salino (NaCl 100 mM) e utilizando primers da subunidade A da V-ATPase foi obtido através de RT-PCR os cDNA o qual foi inserido no plasmídeo pGEM-Teasy e posteriormente sequenciado. A análise da sequência de nucleotídeos foi realizada utilizando o programa BLAST mostrando que o fragmento clonado corresponde ao fragmento do gene da subunidade A da ATPase.

Na figura 20 observa-se a sequência da fita senso 5'-3' do cDNA do *VuVHA-A* apresentando um tamanho molecular de aproximadamente 1125 pb, o qual corresponde a um fragmento parcial do mesmo. As sequências de aminoácidos deduzidas da sequência de nucleotídeos estão mostradas na figura 20. Esses resultados foram depositados no GenBank com número de acesso DQ056751.

```

gcctcctgatgccatgggaaagattacctacattgcacccgctggccaatattctataacg
  P P D A M G K I T Y I A P A G Q Y S I T
gatactgtattggaacttgagtttcaaggtgtcacaagaattcaccatgcttcagacc
  D T V L E L E F Q G V T K K F T M L Q T
tggcctgtacgtaccccaaggcctggtgcatcaaaacttgacagctgatactcctcttctt
  W P V R T P R P V A S K L A A D T P L L
actggtcagcgtggttcttgatgcccttttcccctcagttcttgggtgggacctgtgccata
  T G Q R V L D A L F P S V L G G T C A I
cctggagcttttggctgtgggaaaacagttatcagtcaggctcttttctaagtattccaat
  P G A F G C G K T V I S Q A L S K Y S N
tctgatgctgtgtctacggttggttgtggggaacgtggaaatgaaatggcagaggtcctc
  S D A V V Y V G C G E R G N E M A E V L
atggatttcccccaacttacaatgacattacctgatggctcgtgaagaatctgtcatgaag
  M D F P Q L T M T L P D G R E E S V M K
cgtacaacactgggtggctaacacttcaaacatgcccggtggcagcccgtgaagcttcaatt
  R T T L V A N T S N M P V A A R E A S I
tatacaggaatcacattagctgagatatttttagagatatgggttacaatgtcagtatgatg
  Y T G I T L A E Y F R D M G Y N V S M M
gctgattctacatctagatgggcagaagcattgcgtgaaatctctggacgactggcagag
  A D S T S R W A E A L R E I S G R L A E
atgcctgcagatagtgatatacctgcttaccttgctgctcgttttagcctcttttctatgaa
  M P A D S G Y P A Y L A A R L A S F Y E
cgtgctgggaaagtaaaatgtcttggaggccctgaacgtaccggtagtgtacaattggt
  R A G K V K C L G G P E R T G S V T I V
gggtgctgtttcaccacctggaggagatttctcagatcctgtgacatctgcaaccctcagc
  G A V S P P G G D F S D P V T S A T L S
atagttcagggttttctggggtttggacaaaaagcttgctcagaggaagcacttttcttctg
  I V Q V F W G L D K K L A Q R K H F P S
gtgaactggcttattttcttattcaaaataactcaacggcactcgaatccttttacgaacaa
  V N W L I S Y S K Y S T A L E S F Y E Q
tttgatccagattttataaacattaggactaaagctcgtgaagttctgcaaagagaagat
  F D P D F I N I R T K A R E V L Q R E D
gacctgaatgaaattgtccagcttgtgggcaaggatgcttttagctgaaggagataagatc
  D L N E I V Q L V G K D A L A E G D K I
accttagaaactgcaagcttttgagagaggattatcttgctcaaaatgccttcacacca
  T L E T A K L L R E D Y L A Q N A F T P
tatgacaaattctgtcccttctacaagtctgttttgatgatgcg
  Y D K F C P F Y K S V W M M

```

Figura 20. Sequência nucleotídica parcial (em preto) e de aminoácidos deduzidos (vermelho) a partir de um fragmento de cDNA da subunidade A da ATPase de *V. unguiculata*.

5.5 Sequenciamento do gene da PPase vacuolar de *Vigna unguiculata*

A partir de DNA genômico de *V. unguiculata* e utilizando primers da V-PPase foi obtido através de PCR um fragmento de DNA o qual foi inserido no plasmídio pGEM-Teasy e posteriormente sequenciado. A análise da sequência de nucleotídeos foi realizada utilizando o programa BLAST mostrando que o fragmento clonado corresponde ao fragmento parcial do gene da V-PPase. O fragmento possui 1242 pb os quais correspondia a 4 éxons e 3 introns.

Na figura 21 observa-se a sequência da fita senso 5'-3' do cDNA do *VuHVP* apresentando um tamanho molecular de aproximadamente 904 pb, o qual corresponde a um fragmento parcial do mesmo. As sequências de aminoácidos deduzidas da sequência de nucleotídeos estão mostradas na figura 21. Esses resultados foram depositados no GenBank com número de acesso DQ056749.

actggttatggtctcgggtgggtcttctatggccttggttgggagagttggcggaggtatt
 T G Y G L G G S S M A L F G R V G G G I
 tataccaaagctgctgatggttggtgctgatcttggttggcaaggttgagaggaatattccc
 Y T K A A D V G A D L V G K V E R N I P
 gaagatgatcccagaaatccagctgtgattgctgacaatgttggtgacaatgttggagat
 E D D P R N P A V I A D N V G D N V G D
 atagctggatgggatctgatctggttggttcatatgaggagtcactcttggctgctgctctt
 I A G M G S D L F G S Y A E S S C A A L
 gttggtgcttccatctcctcatttgggtgaatcatgagttcactgcatgctctaccct
 V V A S I S S F G L N H E F T A M L Y P
 ctcatgtcagttctgtgggtattcttggttggttggctcaccaccttatttggcaactgac
 L I V S S V G I L V C L L T T L F A T D
 ttctttgagatcaaggctgtgaaggagattgagcctgcattgaaaaagcagctcgttatt
 F F E I K A V K E I E P A L K K Q L V I
 tccactgtggtgatgactattgggggtgcagttgtagcttggttgcacttccaacttcc
 S T V L M T I G V A V V S F V A L P T S
 ttcactatcttcaatttggagtgacagaaagacgtcaagagctggcagctattttgggt
 F T I F N F G V Q K D V K S W Q L F L C
 gttgctggttgggtcttgggagcagacttattatcggatttggtaaccgagtagtatactagt
 V A V G L W A G L I I G F V T E Y Y T S
 aatgcatatagtcctggttcaagacgtagctgactcctgcagaactgggtgctgcaactaat
 N A Y S P V Q D V A D S C R T G A A T N
 gttatatttggccttgccttgggatacaagtctgttatcattccaatttggctatagca
 V I F G L A L G Y K S V I I P I F A I A
 attagtatttgggttagtttcaccttggctgccatgtatgggtattgccgtgggtgcaactt
 I S I F V S F T F A A M Y G I A V A A L
 gggatgctgagtaccattgccactgggttggccatagacgcatatgggtccaatcagtgac
 G M L S T I A T G L A I D A Y G P I S D
 aatgctggaggtattgctgagatggctgggtatgagtcacagaattcgtgagagaactgat
 N A G G I A E M A G M S H R I R E R T D
 gcc
 A

Figura 21. Sequência nucleotídica parcial (em preto) e de aminoácidos deduzidos (vermelho) a partir do DNA genômico de *V. unguiculata*.

5.6 Sequenciamento de clones de cDNA do contra-transportador vacuolar (NHX)

A partir de RNA de folha de *V. unguiculata* em condição de estresse salino (NaCl 100 mM) e utilizando primers dos genes *NHX1*, *2*, *3* e *6* foi obtido através de RT-PCR os cDNAs os quais foram inseridos no plasmídeo pGEM-Teasy e posteriormente sequenciados. Na figura 22 observa-se as mini-preparações correspondentes aos plasmídeos com cDNA do *NHX2*, *3* e *6* (Figura 22). O sequenciamento dos incertos confirmou nos três casos que se tratava dos genes *NHX2*, *3* e *6*.

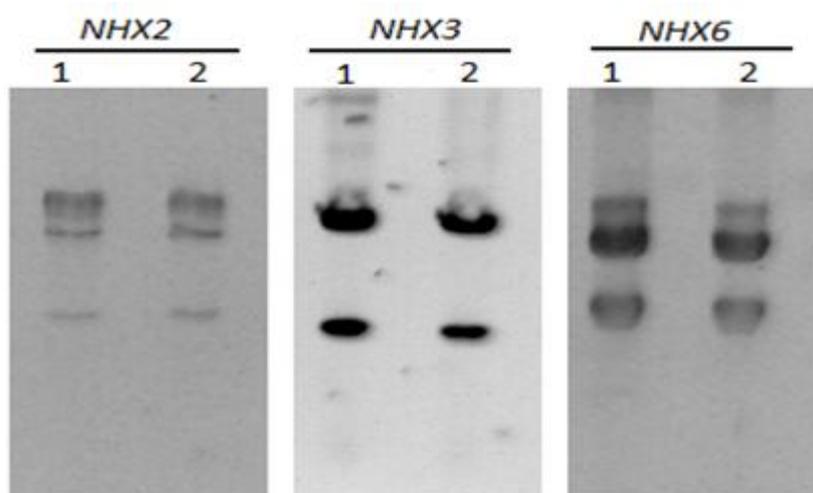


Figura 22. Mini-preparação do plasmídeo pGEM-Teasy dos contra-transportadores vacuolares *NHX2*, *3* e *6*. A linha 1 e 2 corresponde ao plasmídeo com cDNA de *NHX2* clonados.

5.7. Alinhamento de sequências de genes *NHX* e construção de árvore filogenética

Na figura 23 se observa as comparações das sequências protéicas dos genes *NHX* de *V. unguiculata* com genes *NHX* de *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* e *Populus trichocarpa*. Estas regiões correspondem principalmente aos extremos 5' dos genes *NHX*. Observar-se diferentes regiões de consenso mostrando que os genes clonados e sequenciados são realmente *NHX*.

A árvore filogenética, construída através de ferramentas de bioinformática, comparando os gene *NHX* de diferentes espécies de plantas é mostrada na figura 24.

Para a comparação dos genes *NHX1*, 2, 3 e 4 foram usados 18 sequências de plantas enquanto que para a comparação dos *NHX5* e 6 usou-se 5 sequências com os quais se construiu uma árvore filogenética utilizando o método neighbor-joining, usando a ferramenta MEGA 4. Na mesma observa-se a formação de diferentes grupos: um grupo formado pelos genes *VuNHX4* com *AtNHX4* os quais estão filogeneticamente mais relacionados com *VvNHXscaffold4*, um grupo formado pelos *NHX5* e 6 os quais estão próximos filogeneticamente com o grupo formado pelo *PtNHX5* e *AtNHX6* e um terceiro grupo formado pelos *NHX1*, 2 e 3 de *Vigna unguiculata*, *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* e *Populus trichocarpa*.

A árvore indica que os genes *NHX1- 3* apresentam similaridade constituindo um ramo da árvore e os genes *NHX5-6* também formam um ramo, contudo, existe distancia entre eles.

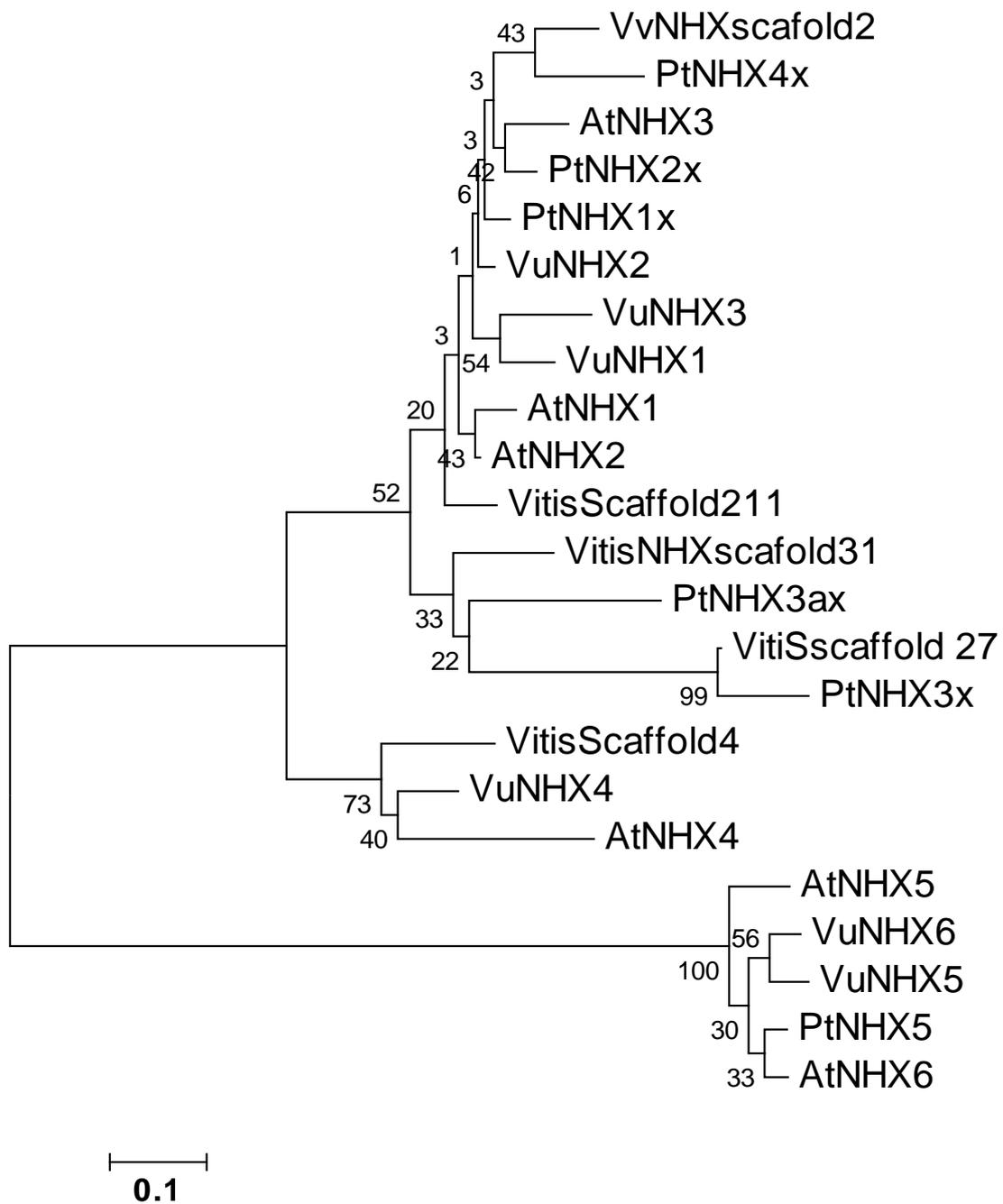


Figura 24. Árvore filogenética dos genes do contra-transportador vacuolar (NHX) de plantas de *V. unguiculata*, *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* e *Populus trichocarpa*.

6. DISCUSSÃO

O feijão de corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma importante fonte de alimento principalmente para as populações da região nordeste e o estresse salino é um dos principais fatores que limitam a sua produtividade. Assim, o estudo de aspectos fisiológicos e bioquímicos da tolerância ao sal em plantas tem atraído considerável interesse desde que a salinidade é um problema crucial afetando o cultivo de plantas em muitas partes do mundo (MUNNS; TESTER, 2008). A salinidade afeta o crescimento das plantas por causar estresse iônico e osmótico. Devido ao gradiente osmótico gerado, elevados níveis de Na^+ nas soluções dos solos dirigem a água para fora das células. Para manter a atividade da água citosólica, requerida para o metabolismo normal da célula, a água move-se do vacúolo para citosol para compensar dessa forma a perda de água.

O desenvolvimento de plantas de *Vigna unguiculata* foi afetado pela salinidade e isso foi avaliado através do efeito do peso fresco das raízes, dos hipocótilos e das folhas do cultivar Vita 5 (Figura 6). A folha foi o órgão mais afetado principalmente nas horas iniciais de estresse. Esse resultado concorda com os de Shabala; Cuin (2007) que diz que o turgor da célula é reduzido quase instantaneamente, levando a uma redução substancial na elongação das folhas e raízes tendo sido observado dentro de minutos após o início do estresse salino. No estresse pela seca tem sido observado que a raiz é o órgão mais afetado, principalmente nas horas iniciais comparado com a parte aérea (SI et al., 2009).

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que o desenvolvimento de plantas de *V. unguiculata* foi afetado pela salinidade (FERNANDES DE MELO et al., 1994; SILVEIRA et al., 2001; OLIVEIRA, 2007). Otoch et al. (2001) mostraram que o crescimento de plântulas estioladas de *V. unguiculata* cv. Vita 3, semeadas em presença de 100 mM de NaCl, foi inibido pela salinidade sendo o epicótilo a parte mais afetada. De acordo com Costa et al. (2003), a cultivar Vita 3 apresentou tolerância intermediária à salinidade (100 mM por 17 dias), em comparação a outras cultivares da mesma espécie. Portanto, a definição do grau de tolerância das plantas a estresses ambientais carece de especial atenção diante da relatividade dos mecanismos de ajustamento metabólico

induzido face ao efeito do tempo de exposição ao estresse e às condições ambientais, em diferentes espécies e cultivares. As plantas diferem grandemente na tolerância a salinidade, sendo refletido nas diferentes respostas de crescimento. Nos cereais, o arroz é mais sensível enquanto que a cevada que é mais tolerante. O trigo (pão) é moderadamente tolerante e o trigo durum é menos tolerante. A variação de tolerância ao sal em espécies dicotiledôneas é igual a de espécies monocotiledôneas (MUNNS; TESTER, 2008). É conhecido que muitas espécies de plantas são glicófitas, e estas não são capazes de crescer em altas concentrações de sal no solo (SHABALA; CUIN; 2007).

O efeito prejudicial da salinidade no crescimento das plantas varia nas diferentes espécies vegetais. A percepção de diferentes sinais pelas plantas, entre eles os induzidos pelo estresse, pode envolver uma resposta integrada levando a uma modulação apropriada da expressão gênica. Os produtos desses genes funcionam não somente na tolerância ao estresse, mas também na regulação da expressão gênica e na transdução de sinais (SI et al., 2009). A combinação de mudanças bioquímicas e fisiológicas em nível celular e molecular tais como, um aumento do hormônio de estresse ABA, acumulação de vários osmólitos e proteínas acopladas com um eficiente sistema antioxidante são conhecidos por resultar na tolerância ao estresse. Os produtos desses genes são classificados dentro de dois grandes grupos (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; 1997 apud SI et al., 2009): (1) aqueles que protegem as células das plantas contra o estresse, tais como proteínas do choque térmico, as proteínas Lea abundantes na embriogênese tardia, osmoprotetores, proteínas anti-congelamento, transportadores, enzimas de detoxificação, e (2) aqueles que funcionam como cascatas de sinalização e controle transcricional, tais como quinases, fosfolipases e fatores transcricionais.

As plantas têm desenvolvido mecanismos para limitar a entrada de Na^+ e aumentar a exclusão de Na^+ , ou sequestrar Na^+ para dentro dos vacúolos para que elas sobrevivam em condições de estresse salino (YU et al., 2007). *Vigna unguiculata*, assim como outros feijões, são capazes de excluir de maneira eficiente os íons Na^+ e as espécies tolerantes parecem impedir o transporte de Na^+ para a parte aérea evitando o efeito prejudicial do sal no metabolismo vegetal (Marschner, 1986, Fernandes de Melo et al, 1994).

O conteúdo dos íons Na^+ e K^+ foram analisados em plântulas de *V. unguiculata* cv. Vita 5 em resposta ao estresse salino. O teor de Na^+ nas raízes, nos hipocótilos e nas folhas aumentou em decorrência da exposição das plantas à salinidade (Figuras 7, 8 e 9). Os maiores aumentos do conteúdo de Na^+ foram observados em raiz, seguido do hipocótilo e das folhas. Resultados semelhante foram encontrados por Zahran et al. (2007) trabalhando com duas espécies de leguminosas com diferentes graus de tolerância a salinidade. Costa et al. (2004) e Oliveira (2007) analisando os íons inorgânicos de cultivares de *V. unguiculata* mostraram que os teores de Na^+ de folhas e raízes aumentaram de forma significativa em resposta à salinidade.

Fernandes de Melo et al. (1994) demonstraram que a capacidade de manter íons Na^+ em maior quantidade nas raízes minimizando o transporte desse íon para a parte aérea das plantas é uma resposta característica de plantas de *V. unguiculata* submetidas ao estresse salino. De fato, a concentração de Na^+ em raízes de plantas de feijão de corda submetidas ao estresse salino foi maior que a concentração de Na^+ em folhas (Figuras 7 e 9).

O conteúdo de íons K^+ foi menor em plantas submetidas ao estresse salino quando comparado ao controle em todos os órgãos estudados (Figuras 7, 8 e 9). Esses resultados são concordantes com os obtidos por Zahran et al. (2007) e podem ser explicados pelo fato de que um dos maiores danos da salinidade é que ela induz uma desordem nutricional e especificamente, deficiência de K^+ . Primeiro, altas concentrações de Na^+ no solo substancialmente reduz a atividade de muitos nutrientes essenciais, incluindo o K^+ . Segundo, o Na^+ compete com K^+ por sítios na membrana plasmática, incluindo tanto canais de baixa afinidade como os canais de cátions não seletivos (NSCC), quanto os transportadores de alta afinidade (HKT) (SHABALA; CUIN; 2007). Dessa forma, a toxicidade metabólica do Na^+ parece ser o resultado da sua capacidade de competir com o K^+ pelos sítios de ligação que são essenciais para a função celular. Mais de 50 enzimas são ativadas por K^+ e o Na^+ não pode substituí-lo nessa função (BHANDAL; MALIC, 1998).

A relação K^+/Na^+ em raízes, hipocótilos e folhas de plantas de *V. unguiculata* (Tabela 4) diminuiu após a exposição ao estresse salino. Entretanto, uma diminuição mais

pronunciada foi observada nas raízes, seguido dos hipocótilos e das folhas, mostrando uma tentativa do cultivar Vita 5 em evitar que o excesso de Na^+ atinja a parte aérea das plantas. Altos níveis de Na^+ ou baixas relações K^+/Na^+ podem afetar vários processos enzimáticos no citoplasma. Além disso, a síntese de proteínas requer altas concentrações de K^+ , pois o íon K^+ é importante para a ligação do tRNA aos ribossomos (BLAHA et al., 2000).

A concentração citosólica de Na^+ em plantas halófitas e não-halófitas, não deve exceder 150 mM, por que nessas condições, uma variedade de reações metabólicas poderia ser inibida (FLOWERS et al., 1986; WANG et al., 2001). Algumas plantas halófitas possuem glândulas de sal nas suas folhas e outras compartimentalizam o Na^+ , nos vacúolos (HASEGAWA et al., 2000). Dessa forma, os sistemas de transporte na membrana que regulam a homeostase iônica no citoplasma (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) e a acumulação de íons no vacúolo podem ser considerados de crucial importância para a adaptação de plantas às condições salinas (HASEGAWA et al., 2000; MIMURA et al., 2003; NIU et al., 1995; SERRANO et al., 1999). No processo de compartimentalização intracelular, o Na^+ ao entrar nas células é bombeado para o interior do vacúolo evitando que sua concentração aumente no citoplasma (SOBREIRA 2003).

As bombas de prótons vacuolares, V-ATPase e V-PPase, são os maiores componentes das membranas vacuolares das células das plantas (MAESHIMA, 2001). Essas bombas ao funcionarem como transportadores ativos primários constituem-se em sistemas enzimáticos importantes para o metabolismo das plantas. A acumulação de íons Na^+ no vacúolo é dependente da atividade do contra-transportador Na^+/H^+ vacuolar bem como da atividade das bombas de prótons vacuolares (V-ATPase e V-PPase) (KABALA; KLOBUS; 2008). Ambas enzimas são responsáveis pela formação de um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana vacuolar e alguns sistemas de transporte ativo dessas membranas funcionam pelo mecanismo de contra-transporte, $\text{H}^+/\text{substrato}$ (MAESHIMA; YOSHIDA, 1989, MAESHIMA, 2001), permitindo dessa forma que processos fundamentais para o desenvolvimento das plantas, tais como crescimento das células, regulação do pH e a própria manutenção da homeostase iônica sejam realizados com sucesso. O grau de tolerância das plantas ao estresse salino depende da possibilidade de uma osmorregulação e

da exclusão de íons tóxicos do citoplasma pela saída desses íons através da membrana plasmática e/ou da compartimentalização desses íons no vacúolo (COLOMBO; CERANA, 1993; GAXIOLA et al., 2007). Tem sido observado, em várias espécies vegetais, que o mecanismo de tolerância ao sal reside no âmbito celular. A exclusão e o seqüestro de íons, o ajustamento osmótico, a proteção a macromoléculas, a homeostase de lipídios de membrana e a função do sistema de transporte de membrana em meio salino são importantes estratégias celulares que conferem a tolerância ao sal (Mansour et al., 2003).

Os níveis de transcritos das subunidades A e E da V-ATPase, da V-PPase e dos contra-transportadores vacuolares (NHX2 e NHX6) de folhas e raízes *V. unguiculata* submetidas a estresse salino (NaCl 100 mM) e estresse osmótico (PEG 200,67 g/L) foram analisados através de RT-PCR. A análise da expressão do *VuVHA-A* de folhas e raízes de plântulas de *V. unguiculata* submetidas ao estresse salino mostrou-se diferente (Figuras 10A, B e C). Enquanto que a expressão do *VuVHA-A* de folhas aumentou apenas com 6 horas (44,8%) e diminuiu com 12 (4%) e 24 (26%) horas de estresse (Figuras 10A e C), em raízes, a expressão do *VuVHA-A* aumentou 54,5, 170 e 5,2% com 6, 12 e 24 horas, respectivamente (Figuras 10B e C). Resultados semelhantes foram encontrados por Fukuda et al. (2004) que observaram que o nível de transcrito da subunidade A da V-ATPase (*HvVHA-A*) de raízes de cevada aumentou após adição de 200 mM de NaCl. Janicka-Russak; Klobus; (2007) mostraram que a expressão do *VHA-A* de membrana plasmática de raízes de pepino aumentou após tratamento com NaCl em relação ao controle.

A expressão de duas isoformas do *VuVHA-E* de folhas e raízes de *V. unguiculata* também foi diferente (Figuras 11A, B e C). Enquanto que em folhas ambas isoformas tiveram o teor de transcritos diminuído com 6, 12 e 24 horas de estresse salino (Figuras 11A e C), nas raízes observou-se um aumento de 20 e 27,7% nas duas isoformas (2 e 3) respectivamente, com 6 horas de estresse salino e ainda, um aumento de 16,6% da isoforma 2 com 24 horas (Figuras 11B e C). Popova e Gollmack (2006) encontraram que o teor de transcritos do *VHA-E* em folhas de *Lobularia marítima* aumentou após 6 e 24 horas de estresse.

Visto que a V-ATPase é uma enzima complexa, composta de várias subunidades sua regulação é intrincada apresentando padrões de expressão diferentes a níveis de subunidades frente a um mesmo estresse. Ademais, algumas subunidades apresentam diferentes isoformas as quais também apresentam padrões diferentes de regulação. Esse panorama torna-se mais complicado, pois essa enzima apresenta regulação transcricional, pós-transcricional e traducional. Essas características indicam a importância da célula vegetal em regular a homeostase iônica (RATAJCZAC, 1999).

Também foi analisada a expressão do gene *HVP* de *V. unguiculata* outro transportador primário importante na manutenção da homeostase iônica. A análise da expressão do *VuHVP* de folhas e raízes submetidas a estresse salino mostrou-se semelhante (Figuras 12A, B e C). A expressão do *VuHVP* em folhas e raízes aumentou após 6 e 12 horas e diminuiu com 24 horas de estresse, entretanto pode-se observar que em folhas o maior aumento foi com 6 horas (66,6%) em relação a 12 horas (7,4%) (Figuras 12A e C) e nas raízes observa-se um maior aumento com 12 horas (200%) em relação a 6 horas (33,3%) (Figuras 12B e C). Fukuda et al., (2004) trabalhando com duas isoformas do *HVP* de cevada (*HVP1* e *HVP10*) observaram que o estresse salino induz um aumento na expressão de ambas isoformas.

Quando comparamos a expressão dos genes da V-ATPase com a expressão do gene da V-PPase submetidos a estresse salino podemos observar uma maior expressão do gene da V-PPase em relação aos genes das subunidades da V-ATPase indicando ser essa bomba de próton mais ativa no estresse salino do que a V-ATPase. Entretanto, sabe-se que a V-PPase complementa a atividade da V-ATPase que mantém o aumento da atividade de bombeamento de prótons vacuolar total mediado pelo sal (FUKUDA et al., 2004). Portanto, a V-PPase e a V-ATPase constituem-se em importantes mecanismos para promover a tolerância ao sal e o ajustamento osmótico, dado que, elas produzem um gradiente de prótons que dirige a força para a contra-transportador Na^+/H^+ assim como outros transportadores de membrana. Isto é reforçado dado que plantas que superexpressão o gene da V-PPase aumentam a tolerância ao sal e seca (GAXIOLA et al., 2001).

Para melhor avaliar o estabelecimento de plântulas de *V. unguiculata* submetidas ao estresse salino também foi medido o teor de transcritos dos contra-transportadores vacuolares (NHX2 e NHX6) de folhas e raízes. A análise da expressão dos genes *VuNHX2* e *VuNHX6* foi feita através de RT-PCR utilizando *primers* específicos/degenerados.

O teor de transcritos do *VuNHX2* de folhas e raízes de *V. unguiculata* submetidas a estresse salino (NaCl 100 mM) foi semelhante, aumentando com 6, 12 e 24 horas (Figuras 13A, B e C) contudo, observa-se que esse aumento foi mais intenso nas raízes (72,7, 290 e 44,7%) (Figuras 13B e C) em relação as folhas (37,5, 50 e 27,2)(Figuras 13A e C) com 6, 12 e 24 horas, respectivamente. Quando analisado o teor de transcritos do *VuNHX6* de folhas e raízes nas mesmas condições observa-se comportamento semelhante, com aumento da expressão em todas as horas estudadas (Figuras 14A, B e C). Nesse caso, ao comparar a expressão entre folhas e raízes percebe-se uma maior intensidade de expressão nas folhas (70, 60 e 150%) do que nas raízes (31,9, 1,6 e 13,7%) com 6, 12 e 24 horas de exposição ao NaCl 100 mM, respectivamente. Muitos estudos têm sido feito mostrando a importância dos contra-transportadores vacuolares nos mecanismos de tolerância ao estresse salino. Fukuda et al. (2004) demonstraram que os níveis de transcritos *HvNHX1* aumentaram em raízes após 5 e 12 horas de estresse salino. Li et al. (2008) mostraram que o teor de transcrito do *CgNHX1* aumentou em diferentes concentrações de NaCl sendo que esse aumento foi mais notável com 400 mM. Sotossanto et al. (2007) em plantas de *Arabidopsis thaliana* e Xia et al (2002) em plantas de *Beta vulgaris* analisaram a expressão do gene *NHX1* verificando um aumento da expressão desse gene induzido pelo sal. Zahran et al. (2007) analisaram a expressão de diferentes genes *NHX* (*NHX1*, *NHX2*, *NHX3* e *NHX4*) em folhas e raízes de duas leguminosas com diferente tolerância a salinidade. Eles observaram que o padrão de expressão dessa família multigênica é diferente em folhas e raízes e também em relação a concentração de NaCl no meio. Esses resultados são semelhantes aos encontrados em *V. unguiculata* quando observa-se um maior padrão de expressão para o *VuNHX2* (Figuras 13A, B e C) em relação ao *VuNHX6* (Figuras 14A, B e C). Yu et al., (2007) mostraram que a expressão do gene *NHX2* aumentou em raízes de trigo tratadas com NaCl e Ye et al., (2009) mostraram que a expressão dos genes *NHX1-6* de raiz, caule e folhas de *Populus euphratica* aumentou quando submetidos à elevada concentração de NaCl por seis horas. Estes

resultados indicam a importância dos contra-transportadores em plantas submetidas a estresse salino.

A salinidade além do estresse iônico induz também um estresse osmótico que pode levar a planta a um rompimento da atividade celular normal ou eventualmente causar a morte da planta. Em condições naturais, o aumento da salinidade e da seca são as principais causas do estresse osmótico das plantas (XIONG; ZHU, 2002). As células vegetais podem-se ajustar ao estresse osmótico através da pressão osmótica interna, um processo que é facilitado pelo acúmulo de solutos no vacúolo. O ajuste osmótico é também uma resposta fundamental da célula ao estresse salino. Assim, com o intuito de avaliar o padrão de expressão das bombas de prótons e dos contra-transportadores vacuolares de plantas de *Vigna unguiculata* submetidas a estresse osmótico, também foi analisado a expressão dos genes das bombas de prótons (VHA-A, VHA-E e HVP) e dos contra-transportadores (NHX2 e NHX6) de folhas e raízes de *Vigna unguiculata* submetidas a 6, 12 e 24 horas de estresse osmótico adicionando 200,67 g/L de PEG a solução nutritiva.

A análise do padrão de expressão dos genes dos transportadores primários e secundários do vacúolo de folhas e raízes *Vigna unguiculata* submetidas a estresse osmótico (PEG 200,67 g/L) mostrou-se diferenciada. Ao comparar a expressão do *VuVHA-A* de folhas e raízes de feijão submetidas a estresse osmótico observa-se um aumento da expressão nas folhas com 6 (28,5%), 12 (25%) e 24 (44,4%) horas (Figuras 15A e C) enquanto que nas raízes observa-se uma elevada expressão com 12 horas (Figuras 15B e C). Resultados semelhantes foram encontrados por Fukuda et al. (2004) que observaram uma diminuição da expressão do gene da subunidade A de raízes de cevada (*HvVHA-A*) após 24 horas de estresse osmótico (400 mM de Manitol).

A resposta do gene da subunidade E da V-ATPase (*VuVHA-E*) de folhas e raízes submetidas ao estresse osmótico também foi diferente. Nas folhas predominou uma diminuição no padrão de expressão nas duas isoformas analisadas (Figuras 16A e C) enquanto que nas raízes predominou um aumento da expressão nas duas isoformas do gene analisadas (Figuras 16B e C). Esses resultados evidenciam uma regulação diferenciada desses

genes nos diferentes tecidos da planta em condições de estresse osmótico.

O estudo da expressão do gene da V-PPase (*VuHVP*) mostrou que em folhas esse gene parece não responder ao estresse osmótico pois houve uma diminuição da expressão do gene de 17, 31 e 20% com 6, 12 e 24 horas de estresse, respectivamente (Figuras 17A e C). Já nas raízes a expressão do *VuHVP* aumentou 38,8 e 260% com 6 e 12 horas de estresse, respectivamente e diminuiu 7% com 24 horas de estresse (Figuras 17B e C). Fukuda et al. (2004) relataram um aumento da expressão do *HVP* de raízes de cevada após 5 horas de estresse osmótico e que após 24 horas de estresse havia uma diminuição da expressão.

A expressão dos genes dos contra-transportadores vacuolares *VuNHX2* e *VuNHX6* de folhas e raízes de *Vigna unguiculata* submetidas a estresse osmótico foi diferente. A expressão do *VuNHX2* em folhas e raízes aumentou com 12 e 24 horas (Figuras 18A, B e C). Já a expressão do *VuNHX6* de folhas de *V. unguiculata* aumentou 600, 65 e 90% após 6, 12 e 24 horas de estresse respectivamente, enquanto que nas raízes só houve aumento da expressão com 6 horas (54,3%).

Em plantas de cevada foi observado um aumento do nível de transcrito de *NHX1* após o estresse osmótico (FUKUDA et al., 2004). A expressão das bombas vacuolares e dos contra-transportadores Na^+/H^+ tem sido pouco estudado em plantas submetidas a estresse osmótico, tornado o presente trabalho uma importante contribuição para conhecimento do ajustamento das plantas face a esse estresse.

Uma árvore filogenética utilizando 23 seqüências de *NHX* de *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa* e genes *NHX* seqüenciado nesse trabalho. Uma árvore semelhante foi obtido por Yokoi et al., 2002 utilizando seqüências de genes *NHX* de *Ipomoea nil*, *Oryza sativa*, *Atriplex gamelin* e *Arabidopsis thaliana* onde observa-se que os genes *AtNHX1-4* formam um grupo mais divergente dos genes do grupo *AtNHX5-6*. Yu et al. (2007) construíram uma árvore filogenética utilizando 21 seqüências de genes *NHX* de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Populus euphatica*, *Atriplex gamelin*, *Ipomoea nil*, *Zea mays* e

Gossipium hirsutum e observaram que existe semelhança entre os genes *NHX1-4* estando esses genes mais distantes dos genes *NHX4* e ainda mais distantes dos genes *NHX5-6*.

Os presentes resultados demonstram que a participação das bombas de prótons e os contra-transportadores vacuolares são importantes para o ajuste das plantas de feijão de corda em condições de estresse salino e de estresse osmótico.

7. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que o estresse salino inibiu o crescimento e reduziu a relação K^+/Na^+ das plântulas. O estudo da expressão dos genes das bombas de prótons (*VuVHA-A*, *VuVHA-E*, *VuHVP*) e dos contra-transportadores Na^+/H^+ vacuolares (*VuNHX2* e *VuNHX6*) de folhas e de raízes em *Vigna unguiculata* foi diferencialmente regulada em função do estresse aplicado (salino e osmótico) e dos tempos de exposição aos referidos estresses (6, 12 e 24 horas), revelando que o gene *VuHVP* parece ter papel crucial em resposta ao estresse salino e os genes *VuVHA-A* e *VuVHA-E* em resposta ao estresse osmótico. Ademais, os genes dos contra-transportadores foram superexpressos em resposta a ambos estresses revelando a participação dos mesmos nos mecanismos de ajustamento osmótico e iônico das plantas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE JÚNIOR AS., SOBRINHOS CA., BASTOS EA., FREIRE FOLHO FR. Embrapa Meio Norte. Disponível em: [HTTP://sistemasdeprodução.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/feijãoocaupi/importância.html](http://sistemasdeprodução.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/feijãoocaupi/importância.html). Acesso em: 20 maio 2004.

ARAÚJO JPP, WATT EE. O Caupi no Brasil. Brasília: EMBRAPA/CNPAF, 1988.

ASHRAF M., AHMAD S. Influence of sodium chloride on ion accumulation, yield components and fibre characteristics in salt-tolerance and salt sensitive lines of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Field Crops Research**, v. 66, p. 115-127, 2000.

ASPE MP, BLUMWALD E. Na⁺ transport in plants. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2247-2254, 2007.

ASPE MP., AHARON GS., SNEDDEN WA., BLUMWALD, E. Salt tolerance conferred by overexpression of vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. **Science** v. 285, p. 1256-1258, 1999.

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

BARKLA BJ., PANTOJA O. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. **Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 47, p. 159 – 184, 1996.

BASSHAM DC. Plant autophagy—more than a starvation response. **Current Opinion in Plant Biology**. v.10, p. 587-593, 2007.

BAYKOV AA., DUBNOVA EB., BAKULEVA NP. *et al.* – Differential sensitivity of membrane-associated pyrophosphatases to inhibition by diphosphonates and fluoride delineates two classes of enzyme. **FEBS** v. 327, p. 199-202, 1993.

BENNETT AB., SPANSWICK RM. H⁺-ATPase activity from storage tissue of *Beta vulgaris* H⁺/ATP stoichiometry of an anion-sensitive H⁺-ATPase. **Plant Physiol.** v.74, 545-548, 1984.

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

BINZEL M., HASEGAWA PM., RHODES D., *et al.* Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. **Plant Physiol.** v. 84, p. 1408 – 1415, 1987.

BLAHA G., STELZL U., SPAHN CMT., AGRAWAL RK., FRANK J., NIERHAUS KH. Preparation of functional ribosomal complexes and effect of buffer conditions on tRNA positions observed by cryoelectron microscopy. **Methods in Enzymology** v. 317, p. 292-309, 2000.

BLUMWALD E., AHORON, GS., APSE MP. Sodium transport in plant cells. **Biophysica Acta** v.1465: 140-151, 2000.

BOLLER T., VOGELI U. – Vacuolar localization of thelylene – induced chitinase in bean leaves. **Plant Physiol.** v. 74, p. 442 – 444, 1984.

BOLLER T., WIEMKEN A. Dynamics of vacuolar compartmentation. **A. Rev. Plant Physiol.** v. 37, p. 137 – 164, 1986.

BRINI F., HANIN M., MEZGHANI I., BERKOWITZ GA., MASMOUDI K. Overexpression of wheat Na^+/H^+ antiport *YNHX1* and H^+ -pyrophosphatase *TVP1* improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. **Journal of Experimental Botany**, v.. 58 p. 301-308, 2007.

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

BUCHANAN BB., GRUISSEM W., JONES RL. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland, 2000.

BYRT CS., PLATTEN JD., SPIELMEYER W., JAMES RA., LAUGUDAH ES., DENNIS ES.,TESTER M., MUNNS R. HKT1;5-like cation transporters linked to Na^+ exclusion loci in wheat *Nax2* and *Kna1*. **Plant Physiol** v. 143, p. 1918-1928, 2007.

CHANSON A., TAIZ L. Evidence for an ATP-dependent proton pump on the golgi of corn coleoptiles. **Plant Physiol.** v. 73, p. 921 - 928, 1985.

CHAUHAN S., FORSTHOEFEL N., RAN Y., QUIGLEY F., NELSON DE., BOHNERT HJ. Na^+/myo -inositol symporters and Na^+/H^+ antiport in *Mesembryanthemum crystallinum*. **Planta J** v. 24, p. 511-522, 2000.

CHEN H. JIANG JG. Osmotic resposes of *Dunaliella* to the changes of salinity. **Journal of Celular Physiology** v. 219, 251-258, 2009.

COLOMBO,R., CERANA, R. – Enhanced Activity of Tonoplast Pyrophosphatase in NaCl-Grown Cells of *Daucus carota*. **J. Plant Physiol.** v. 142, p. 226 – 229, 1993.

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

COSTA JH., HASENFRATZ-SAUDER MP., PHAM-THI AT., LIMA MS., DIZENGREMEL P., JOLIVET Y., MELO DF. Identification in *Vigna unguiculata* (L.) Walp of two cDNAs encoding mitochondrial alternative oxidase orthologous to soybean alternative oxidase genes 2a and 2b. **Plant Scienc (Limeric)** v. 167, p. 233-239, 2004.

CUIN TA, MILLER AJ, LAURIE SA, LEIGH RA. Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. **J Exp Bot** v. 54, p. 657–661, 2003.

D'AUZAC J. Membranal ATPase of Lysosomal Vacuoles Lutoids of *Hevea-brasiliensis* Latex. **Phytochemistry** v.16, p. 1881-1885, 1977.

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

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

DORY O., NELSON N. The emerging structure of vacuolar ATPases. **Physiology (Bethesda)** v. 21, p. 317-325, 2006.

DVOŘÁK J, NOAMAN MM, GOYAL S, GORHAM J. Enhancement of the salt tolerance of *Triticum turgidum* L. by the *kna1* locus transferred from the *Triticum aestivum* L. chromosome 4D by homoeologous recombination. **Theor Appl Genet** v. 87, p. 872–877, 1994.

FERNANDES DE MELO D., JOLIVET Y., FAÇANHA A.R, *et al.* - Effect of salt stress on mitochondrial energy metabolism of *Vigna unguiculata* cultivars differing in NaCl tolerance. **Plant Physiol.** – v. 32, p. 405 – 412, 1994.

FERY RL. Development of improved southern varieties for the southern United States: an update on the USDA effort. **Vegetable Association Yearbook**, p.53, 2002.

FINBOW ME., HARRISON M. The Vacuolar H⁺-ATPase: A universal proton pump of eukaryotes. **Biochem. J.** v. 324, p. 697 – 712, 1997.

FISCHER-SCHLIEBS E., BALL E., BERNDT E., BESEMFELDER-BUTZ E., BINZEL ML., DROBNY M., MUHLENHOFF D., MULLER ML., RAKOWSKI K., RATAJCZAK R. Differential immunological cross-reactions with antisera against the V-ATPase of *Kalanchoe daigremontiana* reveal structural differences of V-ATPase subunits of different plant species. **Biological Chemistry.** v. 378, p.1131-1139, 1997.

FLOWERS TJ. Improving crop salt tolerance. **J Exp Bot** v. 55, 307-319, 2004.

FLOWERS TJ., HAJIBAGHERI MA., CLIPSON NJW. Halophytes. **Quart Rev Biol.** v. 61 p. 313-337, 1986.

FLOWERS TJ., TROKE PF., YEO AR. – The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev Plant Physiol.* v. 28 p. 89 -121, 1977.

FORGAC M. Structure and properties of the vacuolar H⁺-ATPases. **J.Biol. Chem.** v.274, p. 12951-54, 1999.

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

FUKUDA A., NAKAMURA A., TANAKA Y. Molecular cloning and expression of the Na⁺/H⁺ exchanger gene in *Oryza sativa*. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1, p. 149-155. 1999.

FUKUDA A., TANAKA Y. Effects of ABA, auxin, and gibberellins on the expression of genes for vacuolar H⁺-inorganic pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiport from barley. **Plant Physiology and Biochemistry** v. 44, p. 351-358, 2006.

FUKUDA-TANAKA S., INAGAKI Y., YAMAGUCHI T., SAITO N., IIDA S. Colour-enhancing protein in blue petals. **Nature** 407: 581, 2000.

GAXIOLA RA., LI J., UNDURRAGA S., DANG LM., ALLEN GJ., ALPER SL., FINK GR. Drought- and salt-tolerance plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 98, p. 18830-18835, 2001.

GAXIOLA RA., PALMGREN MG., SCHUMACHER K. Plant proton pumps. **FEBS Letters** v. 581, p. 2204-2214, 2007.

GAXIOLA RA., RAO R., SHERMAN A., GRISAF P., ALPER SL., FINK GR. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 96, p. 1480-1485, 1999.

GREENWAY H., MUNNS R. – Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Ann. Rev Plant Physiol.** – v. 31, p. 149 – 190, 1980.

HAMADA A, SHONO M, XIA T, OHTA M, HAYASHI I, TANAKA A, HAYAKAWA T. Isolation and characterization of a Na⁺/H⁺ antiport gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. **Plant Mol Biol** v.46, 35-42, 2001.

HANANA M., CAGNAC O., YAMAGUCHI T., HAMDI S., GHORBEL A., BLUMWALD E. A grape berry *Vitis vinifera* L.) cation/proton antiport is associated with berry ripening. **Plant Cell Physiol** v. 48, p. 804-811, 2007.

HASEGAWA PM., BRESSAN RA.; ZHU J.-K., BOHNERT H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annu.Ver. Plant. Physiol. Plant Mol.Biol.** v.51, 463-499, 2000b.

HASENFRATZ MP., TSOU CL., WILKINS TA. Expression of two related H⁺-ATPase 16-kilodalton proteolipid genes is differentially regulated in a tissue-specific manner. **Plant Physiol** v. 108, p. 1395-404, 1995.

HE CX., YAN JQ., SHEN GX., FU LH., HOLADAY AS. Expression of an *Arabidopsis* vacuolar sodium/proton antiport gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field. **Plant Cell Physiol** v. 46, p. 1848-1854, 2005.

HOAGLAND DR., ARNON DI. Two water culture method for growing plants without soil. **Calif Exp Stn Circ** v. 347, p. 1-39, 1938.

HOLTUM JAM., SMITH JAC., NEUHAUS HE. Intracellular transport and pathway of carbon flow in plants with crassulacean acid metabolism. **Functional Plant Biology** v. 32, p. 429-449, 2005.

IBGE. Indicadores Agropecuários 1996-2003. Acesso em Setembro de 2004.

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

KABALA K., KLOBUS G. Modification of vacuolar proton pumps in cucumber roots under salt stress. **Journal of Plant Physiology** v. 165, 1830-1837, 2008.

KAESTNER KH., RANDALL SK., SZE H. N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid of the vacuolar H⁺-ATPase from oat roots. **J. Biol. Chem** v. 25, p. 1282-1287, 1988.

KAWAMURA Y., ARAKAWA K., MAESHIMA M., YOSHIDA S. ATP analogue binding to the A subunit induces conformational changes in the E subunit that involves a disulfide Bond formation in plant V-ATPase. **Eur. J. Biochem** v. 268, p. 2801-2809, 2001.

KIM EJ., ZHEN RG., REA PA. Heterologous expression of plant vacuolar pyrophosphatase in yeast demonstrates sufficiency of the substrate-binding subunit for proton transport. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 91, p. 6128-6132, 1994.

KLOPPSTECH K. Diurnal and Circadian rhythmicity in the Expression of Light- Induced Plant Nuclear Messenger-RNAs. **Planta** v.165, p. 502-506, 1985.

LARKIN MA., BLACKSHIELDS G., BROWN NP., CHENNA R., MCGETTIGAN PA., MCWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE IM., WILM A., LOPEZ R., THOMPSON JD., GIBSON TJ., HIGGINS DG. ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LEIGH RA., POPE AJ., JENNINGS IR. Kinetics of the vacuolar H⁺-pyrophosphatase: the roles of magnesium, pyrophosphate, and their complexes as substrates, activators, and inhibitors. **Plant Physiol.** v. 100 , p. 1698-1705, 1992.

LERCHL J., KOENIG S. Molecular cloning, characterization and expression analysis of isoforms encoding tonoplast-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase in tobacco. **Plant Molecular Biology** v.4, p. 833-840, 1995.

LEWIS G., SCHIRE B., MACKINDER B., LOCK M. Legumes of the World London: **Kew Publishing**, 2005.

LI J., YANG H., PERR WA., RICHTER G., BLAKESLEE JJ., BANDYOPADHYAY A., TITAPIWANTAKUN B., UNDURRAGA S., KHODAKOVSKAYA M., RICHARDS EL et al. *Arabidopsis*

H⁺-PPase AVP1 regulates auxin mediated organ development. **Science** v. 310, p. 121-125, 2005.

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

LIU Y., XIONG Y., BASSHAM DC. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Basic Research Paper*. v. 5, 2008.

LOGAN H., BASSET M., VERY AA., SETENAC H. Plasm membrane tranport system in higher plants: from black boxes to molecular physiology. **Plant Physiol** 100: 1, 1997.

LONE MI., KUEH J.SH., JONES RGW, *et al.* – Influence of proline and glycinebetaine on salt tolerance of cultured barley embryos. **J. Expt. Bot.** v. 38, p. 470 – 490, 1987.

LÜTTGE U., RATAJCZAK R. – The physiology, biochemistry and molecular biology of the plant vacuolar ATPase. **Adv. Bot. Res.** v. 25, p. 253 – 296, 1997.

MA XL., ZHANG Q., SHI HZ., ZHU K., ZHAO YX., MA C L., ZHANG H. Molecular cloning and different expression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport gene in *Suaeda salsa* under salt stress. **Biol Plant** v. 48, 219-225, 2004.

MAESHIMA M. Proton pumps of the vacuolar membrane in growing plant cells. **J. Plant Res** v. 109, p. 119 – 125, 1996.

MAESHIMA M. Tonoplast transporters: organization and function. **Annu. Ver. Plant Mol.** 52: 469-497, 2001.

MAESHIMA M. Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1465, p. 37-51, 2000.

MAESHIMA M., YOSHIDA S. Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase form mung bean. **J. Biol Chem.** v. 264 , p. 20068 – 20073, 1989.

MANSOUR MMF., SALAMA KHA., AI-MUTAWA MM. Transport proteins and salt tolerance in plants. **Plant Science.** v. 163, p. 891-900, 2003.

MARGOLLES-CLARK E., TENNEY K., BOWMAN EJ., BOWMAN BJ. The structure of vacuolar ATPase in *Neurospora crassa*. **J. Bioenerg. Biomemb** v.31, p. 1175-1186.

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

MARSCHNER H. Mineral nutrition of higer plants. **London: Academec Press.** 647p, 1986.

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

MARTINY-BARON G., MANOLSON MF., POOLE RJ., HECKER D., SCHERER GFE. Proton transport and phosphorylation of tonoplast polypeptides from Zucchini are stimulated by the phospholipid platelet-activating-factor. **Plant Physiol**. v.99, 1635-1641, 1992.

MARTY F. Plant vacuoles. **The Plant Cell** 11: 587-599, 1999.

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

MIMURA H., NAKANISHI Y., HIRONO M., MAESHIMA M. Membrane topology of the H⁺-pyrophosphatase of *Streptomyces coelicolor* determined by cysteine-scanning mutagenesis. **J. Biol. Chem** v. 279, p. 35106-35112, 2004.

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

MUNNS R., TESTER M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annu Rev. Plant Biol** v. 59, 651-681, 2008.

NAKAMURA Y.; KASAMO K.; SHIMOSATO N. et al. Stimulation of the extrusion of protons and H⁺-ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intact mung bean roots under high-NaCl stress and its relation to external levels of Ca²⁺ ions. **Plant Cell Physiol**. v.33, p. 139-149, 1992.

NAKANISHI Y., MAESHIMA M. Molecular cloning of vacuolar H⁺- pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of mung bean. **Plant Physiol**. v. 116, p. 589 – 597, 1998.

NELSON DL., COX MM. **Lehninger Principios de Bioquímica**. 2^a edição Editora Sarvier, São Paulo, Brasil, 2000.

NIU X., BRESSAN RA., HASEGAWA PM., PARDO JM. Ion homeostasis in NaCl stress **Environments**. **Plant Physiol** v.109: 735-742, 1995.

OHIRA M, SMARDON AM, COLLEEN MH. The E and G subunits of the yeast V-ATPase interact tightly and are both present at more than one copy per V1 complex. **J. Biol Chem** v. 281, 22752-22760, 2006.

OHNISHI M. FUKUDA-TANAKA S., HOSHINO A., TANAKA J., INAGAKI Y., IIDA S. Characterization of a novel Na⁺/H⁺ antiport gene *InNHX2* and comparison of *InNHX2* with *InNHX1*, which is responsible for blue flower coloration by increasing the vacuolar pH in the Japanese Morning Glory. **Plant Cell Physiol** v. 46, p. 259-267, 2005.

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

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

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

OTOCH, M.L.O., SOBREIRA, A.C.M., ARAGÃO, M.E.F., ORELLANO, E.G., SILVA LIMA, M.G., FERNANDES DE MELO, D. Salt modulation of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase activities in *Vigna unguiculata*. **J. Plant Physiol** v. 158, 545-551, 2001.

PARK MING-YOUNG, CHUNG MOON-SOO, KOH HEE-SEOK, LEE DJ, ANH SUNG-JU, KIM CS. Isolation and functional characterization of the *Arabidopsis salt-tolerance 32* (*AtSAT32*) gene associated with salt tolerance and ABA signaling. **Physiologia Plantarum** v. 135, p. 426-435, 2009.

POPOVA OV, GOLLDACK D. In the halotolerant *Lobularia maritima* (Brassicaceae) salt adaptation correlates with activation of the vacuolar H⁺-ATPase and the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter. **J Plant Physiol.** v. 164(10), p.1278-88, 2006.

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

RANDALL S.K., SZE H. Probing the catalytic subunit of the tonoplast H⁺-ATPase from oat roots. **Journal of Biological Chemistry.** v. 262, p. 7135-7141.

RATAJCZAK R. Adaptation of the tonoplast V-type H⁺-ATPase of *Mesembryanthemum crystallinum* to salt stress, C3-CAM transition and plant age. **Bot. Acta** v.107, 201-209, 1994.

RATAJCZAK R; HINZ G; ROBINSON D G. Localization of pyrophosphatase in membranes of cauliflower inflorescence cells. **Planta** v. 2, p. 205-211, 1999.

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

REA PA., POOLE RJ. Proton-translocating inorganic pyrophosphatase in red beet (*Beta vulgaris* L.) Tonoplast Vesicles. **Plant Physiol.** v. 77, p. 46-52, 1985.

REA PA., POOLE RJ. Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 44, p. 157- 180, 1993.

REUVENI M., BENNETT AB., BRESSAN RA. Enhanced H⁺ transport capacity and ATP hydrolysis activity of the tonoplast H⁺-ATPase after NaCl adaptation. **Plant Physiol.** v. 94, p. 524 – 530, 1990.

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

SAIRAM RK., TYAGI A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science** v. 86, 2004.

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

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

SATO MH., MAESHIMA M., OHSUMI Y. et al. Dimeric structure of H⁺-translocating pyrophosphatase from pumpkin vacuolar membranes. **FEBS**, v. 290, p. 177-180, 1991.

SCERER GFE., MARUNY-BARON G., STOFFEL B. A New set of regulatory molecules in plants- a plant phospholipid similar to platelet-activating factor stimulates protein kinase and proton-translocating ATPase in membrane vesicles. **Planta** v.175, 241-253, 1988.

SERRANO O.K.; JOVANOVIC A.; TERZIC A. Inhibition of both Na⁺/H⁺ and bicarbonate-dependent exchange is required to prevent recovery of intracellular pH in single cardiomyocytes exposed to metabolic stress. **Biosci Rep.** v. 19(2), p. 99-107, 1999.

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

SERRANO R., RODRIGUES-NAVARRO, A. Ion Homeostasis during salt stress in plants. **Current Opinion in Cell Biology** 13: 399-404, 2001.

SHABALA S., CUIN TA. Potassium transport and plant tolerance. **Physiologia Plantarum** v. 133, 651-669, 2007.

SHINOZAKI K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiol** v. 115, p. 327-334, 1997.

SI Y., ZHANG C., MENG S., DANE F. Gene expression changes in response to drought stress in *Citrullus colocynthis*. **Plant Cell Rep.** 2009.

SILBERBUSH M., BEM-ASHER J. Simulation study of nutrient uptake by plants from soilless cultures as affected by salinity buildup and transpiration **Plant and Soil** v. 233 p. 59-69, 2001.

SILVEIRA J A G., MELO ARB., RA V., OLIVEIRA JTA . Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**. v. 46, p. 171-179, 2001.

SINGH BB., MOHAN RAJ., DASHIELL KE. – Advances in cowpea research – copublication of international institute of tropical agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agriculture Sciences (JIR CAS). IITA, Ibadan, Nigeria. Prepared for Publication by Sayce Publishing, Devon, UK. 1997.

SMYTH DA., BLACK CC. Measurement of the pyrophosphate content of plant tissues. **Plant Physiol.** v. 75, p. 862 – 864, 1984.

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

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

STEVENS TH., FORGAC M. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺-ATPase). **Annu. Rev. Cell Dev. Bio.** v.13, p. 779-808, 1997.

SUPEKOVA L., SBIA M., SUPEK F., MA Y-M., NELSON N. **J. Exp. Biol.** v.119, 1147- 1156, 1996.
SZALBOLCS I. Soil and salinization. In: Handbook of Plant and Crop Stress. **Mohammad Pessarakli** (ed). New York: Marcel Dekker, Inc. 1994.

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

SZE H., WARD JM., LAI S., PERERA I. Vacuolar type H⁺-translocating ATPase in plant endomembranes: subunit organization and multigene families. **J. Exp. Biol.** v. 172, p. 123 – 136, 1992.

TAIZ L. The plant vacuole. **J. Exp. Biol.** v. 172, p. 113 – 112, 1992.

TAIZ L., ZEIGER E. Fisiologia Vegetal. 3^a edição. – Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAKESHIGE, K., TAZAWA, M. – Determination of the Inorganic Pyrophosphate Level and its Subcellular Localization in *Chara corallina*. **J. Biol. Chem.** v. 264, p. 3262 – 3266, 1989.

TAMURA K., DUDLEY J., NEI M., KUMAR S. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. **Mol Biol Evol.** v. 8, p. 1596-1599, 2007.

TANAKA Y., CHIBA K., MAEDA M., MAESHIMA M. Molecular cloning of cDNA for vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase in *Hordeum vulgare*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.190, p. 1110-1114, 1993.

TEIXEIRA SM., MAY PH., SANTANA AC. Produção e Importância Econômica do Caupi no Brasil. In; Araújo, J.P.P., Watt, E.E., ORG. O Caupi no Brasil. Brasília: **EMBRAPA/iita**, cap.4, p. 101-136, 1988.

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

THOMPSON JD. HIGGINS DG. GIBSON JT. Improving the of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Acids Res.** V. 62, 4673-4680, 1994.

TIMKO MP., RUSHTON PJ., LAUDEMAN TW., BOKOWIEC MT., CHIPUMURO E., CHEUNG F., TOWN CD., CHEN X. Sequencing and analysis of the gene-rich space of cowpea. **BMC Genomics** v. 9, p. 1-20, 2008.

TSIANTIS M., BARTHOLOMEW DM., SMITH JAC. Salt regulation of transcript level for the c subunit of a leaf vacuolar H⁺-ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant J.** v. 9, p. 729–736, 1996.

TZENG CM., HSU LH., PAN RL. Inhibition of tonoplast ATPase from etiolated mung bean seedlings by fluorescein 5'isothiocyanate. **Biochem. J.** v. 285, p. 737-743, 1992.

VENEMA K., QUINTERO F.J., PARDO JM., DONAIRE JP. The Arabidopsis Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. **J. Biol Chem** v. 277, 2413-2418, 2002.

VENEMA K., BELVER A., MARIN-MAZANO MC., RODRIGUEZ-ROSALES MP., DONAIRE JP. A novel intracellular K⁺/H⁺ antiport related to Na⁺/H⁺ antiports is important for K⁺ ion homeostasis in plants. **J. Biol. Chem** v. 25, p. 22453-22459, 2003.

VERA-ESTRELA R., BARKLA B.J., GARCÍA-RAMIREZ L. PANTOJA O. Salt stress in *Thellungiella halophila* activates Na⁺ transport mechanisms required for salinity tolerance. **Plant Physiol** v. 139, 1507-1517, 2005.

VERA-ESTRELA R. BARKLA BJ., BOHNERT HJ., PANTOJA O. Salt stress in *Mesembryanthemum crystallinum* L. cell suspensions activates adaptive mechanisms similar to those observed in the whole plant. **Panta** v. 207, p. 426-435, 1999.

VERDCOURT B. 1970. Studies in the leguminosae papilionoideae for the flora of tropical east Africa. IV. **Kew Bulletin**, v. 24, p. 507-569, 1970.

WALKER RR., LEIGH RA. Mg²⁺-dependent, Cation-stimulated inorganic pyrophosphatase associated with vacuoles of red beet (*Beta vulgaris* L.) **Planta** v. 153, p. 150-155, 1981.

WANG B.; LÜTTGE U.; RATAJKZAK R. Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. **J. Exp. Bot.** v.52, p. 2355-2365, 2001.

WANG Y., SZE J. Similarities and differences between the tonoplast-type and the mitochondrial H⁺-ATPases of oats roots. **J. Biol. Chem.** v.260, p.1 0434-10443, 1985.

WARD JM., SZE H. – Proton transport activity of the purified vacuolar H⁺ - ATPase from oats. **Plant Physiol.** v. 99, p. 925- 931, 1992.

WEINER H., STITT M., HELDT HW. – Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. **Biochem. Biophys. Acta** v. 893, p. 13 – 21, 1987.

WYN JONES RG., POLLARD A. Proteins, enzymes and inorganic ions. In: LÄUCHLI A, PIRSON A, eds. **Encyclopedia of Plant Physiology**. New series. v. 15 B. Berlin: Springer 528-562, 1983.

WYN JONES, R.G. – Salt tolerance. In: **Physiological Processes Limiting Plant Productivity**. C.B. Johnson, (Ed.). Great Britain: Butterworths,. p. 271 – 292, 1981.

XIONG L., ZHU JK. Molecular and aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant Cell Environ**, v. 25, p. 131-139. 2002.

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

XUE ZY., ZHI DY., XUE GL., ZHANG H., ZHAO YX., XIA GM. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum sativum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺. **Plant Sci** v. 167, p. 848-889, 2004.

YAMAGUCHI T., FUKUDA-TANAKA S., INAGAKI I., IIDA S. Genes encoding the vacuolar Na⁺/H⁺ exchanger and flower coloration. **Plant Cell Physiol** v. 42, p. 451-461, 2001.

YAMANISHI H., KASAMO K. Modulation of the activity of purified tonoplast H⁺-ATPase from mung bean (*Vigna radiata* L.) hypocotyls by various lipids. **Plant Cell Physiol.** v.34, p. 411–419, 1993.

YE CHU-YU., ZHANG HE-CHEN., CHEN JIN-HUAN., XIA XIN-LI., YIN WEI-LUN. Molecular characterization of putative vacuolar NHX-type Na⁺/H⁺ exchanger genes from the salt-resistant tree *Populuseuphratica*. **Physiologia Plantarum** 2009.

YOKOI S., QUINTERO FJ., CUBERO B., RUIZ MT., BRESSAN RA., HASEGAWA PM., PARDO JM. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. **The Plant Journal** v. 30, p. 529-539, 2002.

YU JN., HUANG J., WANG ZN., ZHANG JS., CHEN SY. An Na⁺/H⁺ antiport gene from wheat plays an important role in stress tolerance. **J. Biosci** v. 32, p. 1153-1161, 2007.

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

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

ZHANG Y., WANG L., LIU Y., ZHANG Q., WEI Q., ZHANG W. Nitric oxid enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na^+/H^+ antiport in the tonoplast. **Planta** v. 224, p. 545-555, 2006.

ZHAO Q., ZHAO YAN-JUN. ZHAO BAO-CUN., GE RONG-CHAO., LI M., SHEN YIN-ZHU., HUANG ZHANG-JING. Cloning and functional analysis of wheat V- H^+ -ATPase subunit gene. **Plant Mol Biol** v. 69, 33-46, 2009.

ZHU J.-K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Sci** 6: 66-71, 2002.

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