

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

CRISTINA SILVA DE LIMA

**MUDANÇAS NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS
INDUZIDAS POR ESTRESSES ISOLADOS E
COMBINADOS DE SECA E TEMPERATURA ELEVADA EM
FOLHAS DE CAJUEIRO**

**FORTALEZA
2009**

CRISTINA SILVA DE LIMA

**MUDANÇAS NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS
INDUZIDAS POR ESTRESSES ISOLADOS E
COMBINADOS DE SECA E TEMPERATURA ELEVADA EM
FOLHAS DE CAJUEIRO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, área de concentração em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

ORIENTADOR : PROF^o DR. JOAQUIM ALBENISIO GOMES DA SILVEIRA

**FORTALEZA
2009**

Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, área de concentração em Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Universidade.

Dissertação aprovada em _____ de _____ de 2009.

Cristina Silva de Lima

BANCA EXAMINADORA

Prof.º Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, Dr.
UFC/DBBM – Orientador

Sérgio Luiz Ferreira da Silva, Dr.
UFC/ DBBM – Co-orientador

Vânia Marilande Ceccatto, Dra.
UECE/CCS – Conselheira

Agradecimentos

Ao professor Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, pelo profissionalismo, pela paciência, companherismo e dedicação durante todo o período em que me orientou nessa dissertação.

A professora Dra. Vânia Marilande Ceccatto pelo exemplo de mulher e profissional, por muitas vezes ter me aconselhado e incentivado quando da minha opção pela carreira acadêmica.

Ao Dr. Sérgio Luiz Ferreira da Silva pelo exemplo de postura científica, incentivo e colaboração profissional.

Aos mestres do Programa de pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular de plantas, pela contribuição de conhecimentos em minha formação e mestre.

Aos inesquecíveis companheiros, Raquel Fernandes, Tathiana Dutra, Evandro, Naélia, Aurenívia e Ana Karla pela amizade, conselhos, conversas, colaboração e divertidos momentos de descontração e pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei, pelos grandes e pequenos momentos que compartilhamos durante todo esse período em que nos conhecemos.

Aos amigos, pela ajuda, amizade, alegrias e tristezas partilhadas comigo ao longo do processo: Adilton, Rafael, Márcio, Paula e Suyanne e aos colegas do LABPLANT, Eduardo Voigt, Josemir Maia, João Paulo Matos e Abel Lemos, pela convivência e aprendizado.

A nossa turma de mestrandos de 2006, especialmente Adelina e Henrique, pela amizade, pela convivência e agradáveis conversas durante esses dois anos em que dividimos alegria e ultimamente aflições.

Aos meus pais Marlene e José Paiva pelo suporte financeiro e afeto, por confiarem e acreditarem em mim quando eu mesma já não me achava capaz.

Ao meu noivo, Abraão de Farias pelo apoio incondicional e maravilhosa companhia durante esses anos, pelos momentos de paz, compreensão e amor.

Aos meus irmãos Emilene, Scheila e Pitágoras pelo amor, colaboração, compreensão e paciência.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente pela realização desse trabalho.

*Dedico essa Dissertação a minha mãe e
irmãos: Emilene, Scheila, Pitágoras e aos
meus sobrinhos, aos quais amo
incondicionalmente.*

*E no meio de um inverno eu finalmente
aprendi que havia dentro de mim
um verão invencível.*

Albert Camus

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- Universidade Federal do Ceará
- FUNCAP – Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1- Estresses abióticos	1
1.2 - Respostas vegetais ao estresse por temperatura elevada	3
1.3 - Respostas vegetais ao estresse por déficit hídrico.....	5
1.4 - Estresses combinados e respostas vegetais.....	7
1.5 - Estudo proteômico em plantas	9
2- JUSTIFICATIVA.....	14
3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
4 - OBJETIVOS	22
4.1 - Objetivo geral.....	22
4.2 - Objetivos específicos.....	22
Capítulo I.....	23
<i>Mudanças nas frações nitrogenadas em plantas de cajueiro expostas a temperatura elevada</i>	<i>23</i>
1 - INTRODUÇÃO.....	24
2- MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1 - Material vegetal e aplicação dos tratamentos	26
2.2 - Determinações bioquímicas realizadas	26
2.2.1 - Extração de proteínas solúveis e insolúveis	26
2.2.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).....	27
2.2.3 – Determinação das proteínas solúveis e insolúveis totais	28
2.2.4 – Determinação dos aminoácidos livres totais (N α -amino livre)	28
2.2.5 – Determinação da prolina livre.....	29
2.2.6 – Determinação de amônio livre.....	29
2.3 – Delineamento estatístico e análise dos dados	29
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1 – Aspectos morfológicos e concentração de proteínas (pré-teste).....	30
3.2 - Proteínas solúveis e insolúveis em resposta à temperatura elevada.....	33
3.3 – Alterações nos compostos nitrogenados em resposta à alta temperatura	35
4 - CONCLUSÃO.....	38
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
Capítulo II.....	43
<i>Modulação da expressão de proteínas sob efeitos isolados e combinados de seca e temperatura elevada em folhas de cajueiro.....</i>	<i>43</i>
1- INTRODUÇÃO.....	44
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1 – Material vegetal e aplicação dos tratamentos.....	45
2.2- Determinação de proteínas solúveis.....	46
2.3 – Preparo das amostras para eletroforese bidimensional	46
2.4 - Isoeletrofocalização.....	47
2.5 – Equilíbrio das tiras de gradiente de pH imobilizado.....	48
2.6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS-PAGE	49
2.7 – Visualização dos géis bidimensionais (2D).....	49

2.8 – <i>Captura e análise dos géis 2D</i>	50
2.9 - <i>Transferência das proteínas dos géis 2D para PVDF</i>	50
3 - <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	51
3.1 – <i>Concentração de proteínas</i>	51
3.2 – <i>Expressão quantitativa das proteínas em gel bidimensional (2D)</i>	52
3.3 – <i>Expressão qualitativa das proteínas em gel bidimensional (2D)</i>	56
4 - <i>CONCLUSÕES</i>	64
5 – <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS</i>	65
<i>ANEXOS</i>	70

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquema da extração e fracionamento protéico de tecidos de raízes, caules e folhas de plantas de cajueiro.....	27
Figura 2 - Aspecto visual das plantas de cajueiro submetidas às temperaturas de 25; 30; 35; 40; 45 e 50 °C, durante 12 horas. O detalhe demonstra a perda de turgor das folhas e do segmento apical do caule ocorrido a partir das 9 horas de exposição das plantas ao tratamento de 50 °C.....	31
Figura 3 - Mudanças no conteúdo de proteína solúvel (A) e no perfil eletroforético (SDS-PAGE) de proteínas foliares (B) de plântulas de cajueiro após exposição às temperaturas de 25; 30; 35; 40; 45 e 50 °C durante 12 horas.....	32
Figura 4 - Proteínas solúveis (A) e insolúveis (B) em tecidos de raízes, caules e folhas de plantas de cajueiro submetidas a 25 °C e 45 °C por 12 horas. Letras diferentes nas colunas, dentro de cada órgão, representam diferença significativa pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.....	33
Figura 5 - Proteínas solúveis (A), aminoácidos livres totais (B), prolina livre (C) e amônia (D) em tecidos de raízes, caules e folhas de plantas de cajueiro submetidas a 25 °C e 45 °C por 12 horas. Letras diferentes nas colunas, dentro de cada órgão, representam diferença significativa pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.....	36
Figura 6 - Esquema da seqüência de extração de proteínas de folhas de plântulas de cajueiro para corrida eletroforética bidimensional sob condições desnaturantes.....	48

Figura 7 -	Mudanças no conteúdo de proteínas solúveis em folhas de plântulas de cajueiro submetidas aos tratamentos: controle (Irrigadas + 25 °C por 12 h); calor (Irrigadas + 45 °C por 12 h); seca (20 dias de suspensão da rega + 25 °C por 12 h); e seca + calor (20 dias de suspensão da rega + 45 °C por 12 h).....	51
Figura 8 -	Géis bidimensionais de proteínas de folhas de plântulas de cajueiro submetidas aos tratamentos (A) controle (Irrigadas + 25 °C por 12 h); (B) calor (Irrigadas + 45 °C por 12 h); (C) seca (20 dias de suspensão da rega + 25 °C por 12 h); e (D) seca + calor (20 dias de suspensão da rega + 45 °C por 12 h). Em cada gel foram aplicados 200 µg de proteína da fração ressuspensa.....	53
Figura 9 -	Distribuição quantitativa em diferentes faixas de ponto isoelétrico (pI) dos <i>spots</i> encontrados nos géis bidimensionais de cajueiro anão precoce (Clone CCP 06) submetidas aos tratamentos: controle (Irrigadas + 25 °C por 12h); calor (Irrigadas + 45 °C por 12 h); seca (20 dias de suspensão da rega + 25 °C por 12 h); e seca + calor (20 dias de suspensão da rega + 45 °C por 12 h) em câmara BOD sob condições controladas. Os <i>spots</i> escolhidos foram aqueles que apresentaram volume maior que 0,5% em relação ao controle.....	54
Figura 10 -	Relação entre a massa estimada (kDa) e o ponto isoelétrico (pI) dos <i>spots</i> encontrados nos géis bidimensionais de cajueiro anão precoce (Clone CCP 06) submetidas aos tratamentos de calor (Irrigadas + 45 °C por 12 h) em câmara BOD sob condições controladas. Os <i>spots</i> escolhidos foram aqueles que apresentaram volume maior que 0,5% em relação ao controle.....	55

- Figura 11 - Relação entre a massa estimada (kDa) e o ponto isoelétrico (pI) dos *spots* encontrados nos géis bidimensionais de folhas de plântulas de cajueiro expostas aos tratamentos de (A) seca (20 dias de suspensão da rega + 25 °C por 12 h); e (B) seca + calor (20 dias de suspensão da rega + 45 °C por 12 h). Os *spots* escolhidos foram aqueles que apresentaram volume maior que 0,5% em relação ao controle..... 56
- Figura 12 - Separação quantitativa dos *spots* encontrados nos géis bidimensionais de folhas de plântulas de cajueiro submetidas aos tratamentos de calor (Irrigadas + 45 °C por 12 h); seca (20 dias de suspensão da rega + 25 °C por 12 h); e seca + calor (20 dias de suspensão da rega + 45 °C por 12 h). Os grupos funcionais foram estabelecidos pelo agrupamento de cada *spot* isolado após a sua classificação pelo Talgdent (Expasy). Os *spots* escolhidos foram aqueles que apresentaram volume maior que 0,5% em relação ao controle..... 58
- Figura 13 - Mudanças na modulação da expressão de proteínas de folhas de plântulas de cajueiro induzidas pelos tratamentos de calor (Irrigadas + 45 °C por 12 h); seca (20 dias de suspensão da rega + 25 °C por 12 h); e seca + calor (20 dias de suspensão da rega + 45 °C por 12 h). Os *spots* foram comparados com base no controle, representado pelo ponto zero (0), com barras positivas e negativas indicando indução e repressão, respectivamente. Os *spots* foram escolhidos a partir do grupo que apresentava volume maior que 0,5% em relação ao controle..... 60

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Análise proteômica de plantas relacionada a estresse abiótico publicadas em 2006.....	12
Tabela 2 - Identificação de proteínas induzidas pelos estresses de seca e de seca + calor em folhas de plântulas de cajueiro. A identificação foi por meio da seqüência N-terminal e comparação das seqüências obtidas com àquelas existentes em banco de dados do NCBI.....	61
Tabela 3 - Proteínas diferencialmente expressas em folhas de plantas de cajueiro anão precoce (<i>Anacardium occidentale</i> L.) submetidas a estresse por temperatura elevada, identificadas através do <i>TagIdent</i>	71
Tabela 4 - Proteínas diferencialmente expressas em estresse por seca em folhas de cajueiro identificadas por <i>TagIdent</i> ..	73
Tabela 5 - Proteínas diferencialmente expressas em estresse combinado de seca e temperatura elevada em folhas de cajueiro identificadas por <i>TagIdent</i>	75

LISTA DE ABREVIATURAS

2D-PAGE	Gel de eletroforese de poliacrilamida bidimensional
AALL	Aminoácidos livres
CCP	Clone de cajueiro de Pacajús
CDPK	Proteínas quinase cálcio-dependente
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propane sulfonate
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditionitrito
DPP	Dias pós plantio
EROs	Espécies reativas do oxigênio
HSPs	Proteínas de choque térmico
IPG	Gradiente de pH imobilizado
kDa	Kilodáltons
L	Litros
LEA	Proteínas abundantes da embriogênese tardia
M	Molaridade
MAPK	Proteínas quinase do mitogênio ativada
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MS	Espectrometria de massa
N ₂	Nitrogênio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanômetro
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PM	Peso molecular
PRO	Prolina
PTM	Modificações pós- traducionais
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Tris	Tris-hidroaximinometano
V	Volts
W	Watt

MUDANÇAS NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS INDUZIDAS POR ESTRESSES ISOLADOS E COMBINADOS DE SECA E TEMPERATURA ELEVADA EM FOLHAS DE CAJUEIRO

Autora: Cristina Silva de Lima

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira

RESUMO

Um importante mecanismo de sobrevivência celular, realizada pelas espécies vegetais em resposta a situações adversas ou estressantes, é o acúmulo de proteínas, principalmente as solúveis, além de aminoácidos e outros compostos nitrogenados. Nesse estudo, foi determinada distribuição de compostos nitrogenados durante o estresse térmico nas diversas partes da planta. Pode-se observar que com o aumento da temperatura de 25 °C para 45 °C, houve maior acúmulo da fração solúvel em folhas (40%), enquanto que o aumento na fração insolúvel foi de aproximadamente 20% ao passo que o acúmulo de prolina foi de cerca de cinco vezes nas folhas de cajueiro enquanto que nas raízes este aumento foi de apenas uma vez. A concentração de aminoácidos livres totais foi elevada tanto nas folhas (5%) como nas raízes (9%). O conteúdo de amônio sofreu acréscimo tanto nas raízes (30%) como nas folhas (60%) com a elevação da temperatura de 25 °C para 45 °C. O aumento do conteúdo de proteínas de folhas de cajueiro, induzido pelo calor está relacionado com a mobilização de reservas nitrogenadas a partir de raízes e caules e/ou com síntese protéica no tecido foliar. Baseado nessas observações, além da deposição protéica durante o estresse térmico, nós identificamos padrões específicos de expressão protéica do cajueiro frente aos estresses abióticos isolados e combinados. O padrão protéico de folhas de cajueiro foi comparada por eletroforese bi-dimensional (2D) após os tratamentos: condição controle, irrigadas com solução Hoagland & Arnon diluída a 1/4, ou submetidas à seca por suspensão da rega por 20 dias, e posteriormente tanto as plântulas controle como as pré-expostas à seca foram submetidas a 25 °C ou 45 °C. As mudanças na expressão de proteínas foram observadas em 80 proteínas de folhas de cajueiro. Na condição de calor, 7 proteínas aumentaram sua expressão e 3 foram aparentemente sintetizadas *de novo*. Na condição de seca, 10 proteínas aumentaram sua expressão e 2 proteínas foram identificadas como plastocianina e ferredoxina. A análise também mostrou que 17 proteínas foram modificadas pelo efeito da combinação dos estresses e assim como no estresse térmico, 14 proteínas aumentaram sua expressão e 2 foram encontradas somente na combinação dos estresses. Assim, nossos resultados sugerem que a combinação dos estresses deve ser considerada como um novo estado de estresse abiótico em plantas, e não simplesmente uma combinação de fatores abióticos.

Palavras-chaves: *Anacardium occidentale*, estresse hídrico, estresse térmico e padrões protéicos.

PROTEIN EXPRESSION CHANGES AS INDUCED BY SPECIFIC AND COMBINED HEAT AND DROUGHT STRESSES IN CASHEW LEAVES

Author: Cristina Silva de Lima

Adviser: Prof. Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira

ABSTRACT

An important mechanism for survival cell, carried out by the plant species response to adverse or stressful situations, is the accumulation of proteins, especially the soluble proteins as well as amino acids and other nitrogen compounds. In this study, was determined distribution of nitrogen compounds during heat stress in different parts of the plant. It can be observed that with increasing temperature of 25 °C to 45 °C, there was greater accumulation of soluble fraction in leaves (40%), while the increase in the insoluble fraction was approximately 20% while the accumulation of proline was about five times in the leaves of cashew while this increase in the roots was only once. The concentration of total free amino acids was high both in leaves (5%) and roots (9%). The content of ammonium has increased both in roots (30%) and leaves (60%) with increasing temperature of 25 °C to 45 °C. Increasing the protein content in the cashew leaves, induced by heat is related to the mobilization of nitrogen reserves from roots and stems and/or protein synthesis in leaf tissue. Based on these observations, in addition to protein deposition during heat stress, we identified specific patterns of protein expression of cashew against specific and combined to abiotic stresses. The protein pattern in cashew leaves was compared by two-dimensional electrophoresis (2D) after to the treatments: control conditions, irrigated with Hoagland & Arnon solution diluted to 1/4, or subjected to drought by suspension of irrigation for 20 days, and then both the control seedlings as the pre-exposed to drought were subjected to 25 °C or 45 °C. The protein expression changes were in 80 proteins leaves of cashew. In the condition of heat, 7 protein increased the expression and 3 proteins were apparently synthesized *de novo*. In dry condition, 10 proteins increased their expression and 2 proteins were identified as plastocyanin and ferredoxin. The analysis also showed that 17 proteins were altered by the effect of the stress combination and as well as heat stress, 14 increased expression and 2 were found only in the stress combination. Thus, our results suggest that the stresses combination should be considered as a new state of abiotic stress in plants, and not only as a combination of abiotic factors.

Keywords: *Anacardium occidentale*, drought stress, heat stress and proteins patterns

1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1- Estresses abióticos

Durante a exposição a estresses ambientais as plantas exibem uma grande variedade de respostas nos níveis molecular e celular, alterando vários aspectos fisiológicos e metabólicos (HASEGAWA et al., 2000; ZHU, 2002). Mudanças morfofisiológicas e bioquímicas relacionadas ao desenvolvimento da planta (mudanças no ciclo de vida e na relação parte aérea/raiz), com a homeostase iônica (partição, extrusão e seqüestro de íons) e com o metabolismo primário (síntese de osmólitos e expressão de proteínas), são respostas comumente observadas em plantas submetidas a estresses (XIONG e ZHU, 2002).

Algumas dessas respostas são desencadeadas pela sinalização primária e secundária do estresse abiótico. Dessas, algumas mudanças são adaptativas, enquanto que outras são simplesmente conseqüências da injúria causada pelo estresse (XIONG et al., 2002; ZHU, 2002). As respostas ao estresse podem ser consideradas como desvios da norma metabólica, onde a norma é um estado metabólico expresso sob a condição não estressante. Nem todas as mudanças metabólicas são prejudiciais, e um grande desafio para o bioquímico é distinguir as repostas que representam sintomas injuriosos atribuídos a condição estressante, daquelas que levam a uma condição de aclimação, que favorece o crescimento (LIMA, 2007).

O estudo do estresse abiótico em plantas tem avançado intensamente nos últimos anos. Entretanto, a maior parte das pesquisas, que avaliam as mudanças ocorridas no metabolismo vegetal frente a fatores adversos, focam nos estresses quando aplicados isoladamente (BRAY, 2000; MITTLER, 2006). No campo, as diferentes espécies vegetais estão constantemente submetidas a combinações variadas de tipos e intensidades de diferentes estresses abióticos, incluindo irradiância elevada, baixa disponibilidade de água, extremos de temperatura e salinidade elevada (CUSHMAN; BOHNERT, 2000; MITTLER et al., 2001; ZHU, 2002).

Em áreas atingidas pela seca, por exemplo, as plantas estão expostas à combinação de seca e outros estresses abióticos, tais como calor ou salinidade

(MOFFAT, 2002; HEYNE e BRUNSON, 1940). Estresses como o déficit hídrico, temperaturas extremas e salinidade elevada nos solos, causam vários efeitos deletérios no metabolismo das plantas, incluindo redução no potencial hídrico, inibição de divisão e expansão celular, redução de fluidez da membrana e toxicidade iônica, alterando o equilíbrio metabólico celular (ZHU, 2001; TESTER e DAVENPORT, 2003). Assim, vários estresses abióticos são a causa primária de perda da produtividade agrícola em diversas regiões do mundo, por causar limitações severas no crescimento das plantas (BRAY, 2000).

A intensidade com que esses estresses afetam o desempenho das plantas está relacionada com a capacidade de resposta das diferentes espécies aos fatores abióticos. Essas respostas são complexas e envolvem a ativação de uma variedade de mecanismos celulares, incluindo a produção de osmólitos (XIONG e ZHU, 2002), síntese de proteínas do tipo chaperonas, que atuam na proteção de proteínas e membranas (IBA, 2002; BRAY, 2002), proteínas transportadoras associadas com a homeostase hídrica e iônica da célula (APSE e BLUMWALD, 2007; ZHAO et al., 2008) e proteínas envolvidas com o equilíbrio redox celular (MITTLER, 2002; FOYER e NOCTOR, 2003).

Apesar do conhecimento atual acerca de mecanismos moleculares relacionados com a aclimação de plantas a estresse abiótico, ainda existem diversas lacunas sobre a ação da maioria dos genes/proteínas envolvidos na tolerância a estresses (MITTLER, 2006). Os mecanismos exatos, responsáveis pelas vias de percepção, transdução e síntese de moléculas efetoras, que catalisam a série de reações aclimatativas das plantas as condições adversas, são ainda bastante desconhecidos (CHAGAS, 2004). Apesar disso, estudos sobre estresses, que avaliam a expressão de genes/proteínas, têm contribuído consideravelmente para identificação de diversas moléculas ligadas aos mecanismos de aclimação das espécies a diferentes fatores abióticos.

Diversos estudos têm demonstrado que várias mudanças induzidas por calor afetam diferentes aspectos do metabolismo vegetal. Em plantas de arroz expostas a temperatura excessiva ocorre síntese de proteínas tipo chaperonas, que são responsáveis pela estabilização de outras proteínas, além de diversas enzimas relacionadas com a proteção oxidativa (LEE et al., 2007). Em plantas de *Populus euphratica* ocorreu intenso acúmulo de proteínas em folhas após exposição a 42 °C por 72 h, incluindo proteínas relacionadas com o transporte

nuclear, com síntese de lipídios e aminoácidos hidrofóbicos, além de proteínas estruturais (FERREIRA et al., 2006).

O estresse hídrico é outro fator abiótico que compromete diversos aspectos metabólicos da planta, incluindo redução do potencial hídrico, causado pelo acúmulo de osmólitos como glicose, sacarose, inositol, manitol e galactose (CHEHAB et al. 2009), além de distúrbios fotossintéticos que podem levar a indução de danos oxidativos (PERDOMO et al., 1996; JAGTAP et al., 1998; JIANG; HUANG, 2001). As alterações metabólicas induzidas pela seca em plantas são complexas, acarretando alterações deletérias e/ou adaptativas, e sob condições de campo estas respostas podem ser antagônicas ou sinérgicas, podendo ser intensificadas pela sobreposição de outros fatores (CHAVES et al., 2002).

1.2 - Respostas vegetais ao estresse por temperatura elevada

O estresse térmico, causado pelo aumento da temperatura, é um problema agrícola mundial. Altas temperaturas causam transitoriamente ou de forma permanente mudanças morfo-anatômicas, fisiológicas e bioquímicas na planta, que afetam o crescimento e o desenvolvimento, podendo levar a uma drástica redução no rendimento econômico (WAHID e CLOSE, 2007). O estresse térmico afeta o crescimento vegetal em toda a sua ontogênese, embora o limiar de temperatura varie consideravelmente em diferentes fases de desenvolvimento.

Durante a germinação de sementes temperaturas elevadas podem ocasionar desde a redução da velocidade até a completa inibição do processo germinativo, dependendo da espécie vegetal e da intensidade do estresse imposto (GALLIE et al., 1998). Além disso, em etapas posteriores do desenvolvimento vegetal, o excesso de calor pode afetar diferentes processos metabólicos, incluindo fotossíntese, respiração, relações hídricas, fluidez e estabilidade dos sistemas de membranas, além de modular os níveis de hormônios e de metabólitos primário e secundário (WAHID et al., 2007).

Por outro lado, as plantas apresentam um vasto número de respostas interativas frente ao excesso de calor. Por exemplo, enquanto a germinação de sementes de alface é fortemente inibida pelo aumento de somente 1 °C, de 32 °C

para 33°C (ARGYRIS et al., 2005), a exposição de certas plantas ao calor, por curto período de tempo (15 min), pode levar a uma resposta complexa, resultando em aclimação e aquisição de termo-tolerância (CLARKE et al., 2004; KAPLAN et al., 2004). No geral, as plantas exibem diferentes respostas morfofisiológicas em função da temperatura ambiental em que se encontram. Algumas dessas respostas são rápidas, enquanto que outras ocorrem em resposta a estímulos cumulativos da temperatura, variando desde dias até semanas, como quebra de dormência de sementes e a vernalização.

Apesar do conhecimento atual de diferentes mecanismos celulares relacionados com resistência ao calor, os estudos voltados à compreensão das bases moleculares de aclimação a esse estresse são escassos. Nesse sentido, estudos envolvendo a interação genômica/proteômica são essenciais para um melhor entendimento das respostas moleculares de plantas ao calor. Esse entendimento será importante para obtenção de plantas transformadas, com resistência ao calor, e poderão servir de base para produção de cultivares agrícolas que apresentem produções economicamente viáveis sob condições de temperaturas elevadas (WAHID et al., 2007).

Para lidar com o excesso de calor, as plantas ativam várias vias metabólicas envolvidas com a percepção, a transdução de sinal e a síntese de proteínas responsivas ao estresse (CHEPING e HUANG, 2008). As proteínas quinase ativadas por mitogênicos (MAPK), as quinase dependentes de cálcio (CDPK) e as proteínas de choque térmico (HSPs), estão entre as principais proteínas sintetizadas sob condições de estresses (WANG et al., 2003). Dessas, as HSPs são proteínas responsivas ao calor que atuam na proteção de outras proteínas durante os processos de síntese, sinalização e maturação num grande número de eventos celulares (VIERLING, 1991).

Sob condições de estresse térmico as HSPs atuam na estabilização de proteínas, auxiliando do redobramento e evitando desnaturação, e do sistema de membranas (VIERLING, 1991; TOROK et al., 2001). Além disso, as HSPs podem modular vários processos responsáveis pela ativação transcricional e de sinalização celular, sob condições metabólicas normais ou de estresses (WAHID et al., 2007). No entanto, apesar de vários estudos demonstrarem o papel dessas proteínas na proteção metabólica de plantas expostas a diferentes estresses

abióticos, estudos demonstrando seu papel na proteção celular sob condições simultâneas de dois ou mais fatores abióticos são escassos.

1.3 - Respostas vegetais ao estresse por déficit hídrico

O estresse hídrico é um dos mais importantes fatores ambientais que regula o crescimento e o desenvolvimento vegetal (MUNNS, 2002). A redução da absorção de água e nutrientes, associada à intensa restrição fotossintética, são alguns dos impactos negativos da seca no metabolismo vegetal, resultando em perda de produtividade agrícola de várias espécies economicamente importantes (CATTIVELLI et al., 2008). O déficit hídrico limita o crescimento e a distribuição da vegetação e o desempenho das plantas cultivadas mais do que quaisquer outros fatores ambientais (SHAO, 2008).

O déficit hídrico causa várias mudanças na planta, dando início a um grande número de respostas complexas, que começam com a percepção do estresse, desencadeia uma cascata de eventos moleculares, e finaliza com as respostas metabólicas e de desenvolvimento (BRAY, 1993). Sob condições moderadas de seca ocorre diminuição da fotossíntese principalmente devido ao fechamento estomático, e com progressão do estresse essa redução passa a ocorrer por alterações bioquímicas que podem comprometer diretamente a eficiência fotossintética (BRAY, 2000).

Para lidar com o estresse hídrico, as plantas exibem alguns mecanismos morfofisiológicos que permitem o escape à seca (ex: ciclo de vida rápido), resistir à seca (ex: aprofundar raízes, impermeabilizar folhas e fechamento dos estômatos) e tolerar a seca (ex: ajustamento osmótico, fechamento estomático e indução de antioxidantes) (LEVITT, 1980; BRAY, 2000). Desses, os mecanismos que permitem a convivência com a seca provocam fechamento estomático e limitação fotossintética, aumentando a relação NADPH/NADP⁺ e podendo levar a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, pela foto-redução do oxigênio, causando danos oxidativos (FOYER e NOCTOR, 2000).

A proteção contra os danos oxidativos induzidos pelo estresse hídrico em plantas está relacionada com a indução do sistema antioxidante enzimático. Em

plantas de *Vigna unguiculata* submetidas ao estresse hídrico foi verificado aumento significativo da atividade das enzimas SOD, CAT e APX, em raízes, caule e folhas, demonstrando o papel dessas proteínas na proteção oxidativa dos diferentes tecidos na espécie sob condições de seca (MANIVANNAN et al., 2007). Em arroz (*Oryza sativa* L) a resistência à seca está associada com a indução do sistema SOD, CAT e APX, levando ao menor acúmulo de peróxido de hidrogênio e redução dos danos oxidativos (GUO et al., 2006).

Outro grupo de proteínas envolvidas com a resistência à seca são as proteínas abundantes no final da embriogênese (LEA). Embora o papel metabólico das LEA não esteja totalmente elucidado, elas são induzidas numa ampla variedade de espécie vegetais como resultado da dissecação, frio e estresse osmótico, indicando o papel dessas proteínas na proteção contra os efeitos adversos desses fatores (CLOSE, 1996; INGRAM e BARTELS, 1996; THOMASHOW, 1998). Uma característica comum das proteínas tipo LEA é a hidrofobicidade e a relativa estabilidade sob temperaturas elevadas (HOUDE et al., 1995; TOMASHOW, 1998 e 1999).

As deidrinas (DHN) são proteínas pertencentes ao grupo D-II dentro da classificação das proteínas LEA (CLOSE et al., 1989). As DHN são proteínas caracterizadas pela presença de uma região altamente conservada e repetitiva, rica em resíduos de lisina e em aminoácidos polar e carregado, solúvel na presença de temperaturas relativamente elevadas (CAMPBELL e CLOSE, 1997). A manutenção da hidratação celular, a proteção direta de outras proteínas e de lipídios de membranas, além da recuperação de proteínas desnaturadas, são alguns dos mecanismos protetores atribuídos as LEAs (WANG et al., 2003).

Estudos utilizando técnicas de imunolocalização e de fracionamento celular, demonstram a presença de deidrinas no núcleo, no citoplasma e na membrana plasmática de células vegetais (DANYLUK et al., 1998; SARHAN et al., 1997). BOROVSKII et al., (2000) observaram forte indução da expressão de duas deidrinas de mitocôndrias em plantas de *triticum aestivum*, *Secale cereale* e *Zea mays* quando expostas ao estresse de frio. Em plantas de *Quercus ilex* submetidas ao estresse hídrico durante oito semanas, foi observado aumento significativo da expressão de deidrinas em folhas, associado com forte redução do potencial hídrico das plantas (TURCO et al., 2004).

1.4 - Estresses combinados e respostas vegetais

Estresses abióticos como seca, salinidade e temperaturas elevadas são estresses ambientais responsáveis por perdas significativas da produtividade agrícola em diversas partes de mundo (MUNNS, 2002). Isoladamente, esses estresses afetam importantes aspectos morfológicos, bioquímicos e fisiológicos da maioria das espécies vegetais, particularmente das culturas agrícolas, e por esta razão são intensamente estudados (WAHID et al., 2007; CATTIVELLI et al., 2008; MUNNS e TESTER, 2008). A maioria desses estudos utiliza abordagens experimentais que avaliam os efeitos isolados desses fatores no metabolismo vegetal, sem considerar os diferentes aspectos interativos entre os próprios estresses, nem destes com o ambiente (MITTLER, 2006).

Apesar da grande contribuição desses trabalhos para a compreensão atual dos distúrbios metabólicos induzidos pelos estresses abióticos, esses estudos são, ainda, relativamente limitados e não explicam, completamente, os diferentes tipos de interações desses estresses sobre o metabolismo vegetal. No campo, as plantas estão expostas a uma combinação variada de diversos fatores abióticos, os quais interagem fortemente, resultando numa combinação múltipla de fatores adversos que afetam a produtividade (MUNNS, 2002; MITTLER, 2002). Recentemente, estudos têm demonstrado que as respostas metabólicas atribuídas aos efeitos combinados dos estresses de seca e de temperatura elevada, por exemplo, são únicas, e não podem ser obtidas com base nas respostas associadas aos seus efeitos isolados (RIZHSKY et al., 2004; MITTLER, 2006).

A combinação de seca com calor é um exemplo de condição ambiental que comumente ocorre nas áreas agrícolas, particularmente nas regiões áridas e semi-áridas. Essa combinação é um caso típico de interação ambiental onde um fator abiótico possui interação antagônica sobre o outro. Por exemplo, em plantas submetidas à temperatura elevada ocorre aumento da condutância estomática, resposta que está associada à dissipação de calor para redução da temperatura foliar (WAHID et al., 2007; RIZHSKY et al., 2002). No entanto, sob condições de estresse hídrico, o aumento da condutância será limitado pela restrição de água do solo, e nessas condições o efeito do estresse térmico no metabolismo celular será potencializado (RIZHSKY et al., 2004).

A caracterização dos distúrbios fisiológicos, ocorridos em plantas de *Nicotiana tabacum* submetidas aos efeitos isolados e combinados de seca e de alta temperatura, revelou que as alterações induzidas pela combinação desses estresses possuem aspectos distintos daquelas atribuídas aos efeitos isolados dos respectivos estresses. Temperatura elevada aumentou a respiração, a condutância estomática e a temperatura foliar das plantas, enquanto que a seca levou a redução da respiração, da fotossíntese e da condutância. Por outro lado, a combinação da seca com calor intensificou a respiração e a temperatura foliar, comparado ao calor isolado, e reduziu ainda mais a taxa fotossintética, comparado à seca isolada (RIZHSKY et al., 2002).

Uma das respostas bem documentadas em plantas sob estresses abióticos é acúmulo de osmoprotetores de baixo peso molecular, como prolina, glicinabetaina e açúcares (BRAY et al., 2000). Plantas de fumo transformadas, exibindo conteúdo de prolina 10-18 vezes maior, foram mais resistentes à salinidade (KISHOR et al. 1995). Em plantas sob condições de seca moderada ocorre acúmulo de prolina e glicinabetaina, enquanto sob condições de seca severa ocorre acúmulo preferencial de sacarose (HOEKSTRA e BUITINK, 2001). Plantas de fumo expostas à seca foram apresentaram intenso acúmulo de prolina, enquanto naquelas expostas a combinação de seca e temperatura elevada ocorreu acúmulo de sacarose, indicando que na combinação desses estresses a celular utiliza sacarose como principal osmoprotetor (RIZHSKY et al., 2004).

Em plantas de *Arabidopsi* expostas aos efeitos isolados e combinados de seca e alta temperatura, foi observado que o padrão de expressão gênica na combinação dos estresses não reflete estritamente seus efeitos isolados (RIZHSKY et al., 2004). Na seca ocorreu aumento da expressão de 1075 transcritos, dos quais 596 foram aumentados exclusivamente pelo estresse hídrico e 450 foram igualmente induzidos pela combinação de seca e calor. No estresse de calor ocorreu aumento da expressão de 262 transcritos, dos quais 108 foram induzidos somente pelo calor e 124 foram igualmente induzidos pela combinação de seca e calor. As plantas expostas a combinação dos estresses apresentaram aumento de 1057 transcritos, dos quais 450 e 124 foram comuns aos efeitos da seca e calor, respectivamente.

Atualmente, apesar do número relativamente reduzido de estudos focados na compreensão das mudanças metabólicas induzidas pela presença simultânea

de dois ou mais estresses em plantas, os resultados preliminares são contundentes e demonstram que o metabolismo é afetado diferentemente pelos efeitos isolados e combinados dos estresses. Os resultados demonstram, ainda, que os mecanismos de proteção ou defesa para uma combinação de estresses podem ser distintos daqueles atribuídos aos fatores isolados, podendo responder, exclusivamente, a combinação (RIZHSKY et al., 2002). Por fim, os estudos envolvendo os diferentes aspectos metabólicos em plantas, indicam, cada vez mais, que a combinação de estresses deve ser considerada como um novo estado do estresse abiótico, e não apenas uma combinação de estresses (MITTLER, 2006).

1.5 - Estudo proteômico em plantas

A proteômica oferece uma poderosa abordagem para identificar proteínas e vias metabólicas essenciais a respostas e resistência de plantas a estresses. Nos últimos anos, a abordagem proteômica tem sido aplicada com sucesso para o estudo sistemático da respostas vegetais a uma ampla gama de estresses abióticos, incluindo calor (FERREIRA et al., 2006, LEE et al., 2007), seca (PINHEIRO et al., 2005), frio (YAN et al., 2006), estresse oxidativo (WANG et al., 2004), anóxia (CHANG et al., 2000), salinidade (YAN et al., 2005), radiação ultravioleta-B (XU et al., 2008) e substâncias tóxicas (LABRA et al., 2006). Apesar disso, a pesquisa proteômica em plantas ainda esta na fase inicial se comparada aos estudos proteômicos realizados com animais e levedura (ZIVY; VIENNE, 2000; VAN WIJK, 2001, KERSTEN et al., 2002).

Os estudos proteômicos em plantas foram iniciados com milho (TOUZET et al., 1996) e *Arabidopsis thaliana* (SHANOUN et al., 2000). Pelos trabalhos iniciais, a análise proteômica em plantas foi dividida em duas categorias: 1) estudo do proteoma específico de determinados órgãos ou tecidos, com conseqüente elaboração de mapas proteômicos de referência e; 2) análise proteômica comparativa (ROSE et al., 2004). Este último ainda pode ser dividido em: 1) avaliação entre diferentes genótipos; 2) avaliação da influência da aplicação de estímulos no metabolismo e; 3) comparação entre diferentes tecidos e/ou estádios de desenvolvimento vegetal.

O avanço dos estudos proteômicos em plantas tem sido baseado numa abordagem que utiliza mapas de géis bidimensionais (2-DE). Porém, como a resolução de *spots* de proteína em géis 2D é limitado por fatores intrínsecos da técnica com a abundância, o tamanho dos *spots* além de outras propriedades eletroforéticas, o proteoma foi fracionado em sub-proteomas, como de compartimentos sub-celulares, organelas e de complexos protéicos, visando melhorar a sensibilidade, resolução e a confiabilidade dos resultados (JUNG et al., 2000). Nessa linha, vários estudos do proteoma subcelular em plantas, como proteínas da plasmalema, dos cloroplastos, das mitocôndrias e núcleos têm sido realizados (ROUQUIÉ et al., 1997; PELTIER et al., 2000; PRIME et al., 2000; PELTIER et al., 2001; KRUFIT et al., 2001, MILLAR et al., 2001; BAE et al., 2003).

Diversos artigos publicados recentemente relatam estudos proteômicos relacionados com as respostas de plantas aos estresses abióticos de seca, calor e combinação desses dois estresses (Tabela 1). A maior parte dos estudos utiliza os modelos *Arabidopsis*, arroz, *Medicago* e trigo, e a estratégia de proteômica diferencial para identificar mudanças do proteoma induzidas pela aplicação dos estresses. No geral, as análises são baseadas no uso de genótipos selvagens e mutantes, apresentando diferentes níveis de tolerância e susceptibilidade aos estresses. Em vários casos, a proteômica tem permitido inclusive a identificação de genes desconhecidos e a caracterização de suas funções em diferentes aspectos metabólicos, incluindo mecanismos de regulação (VICENT; ZIVY, 2007).

A pesquisa proteômica revelou diferenças no proteoma de genótipos de beterraba apresentando resistência diferenciada a seca. Durante a exposição ao estresse hídrico, o genótipo mais resistente apresentou maior expressão de proteínas envolvidas com mecanismos de percepção e de sinalização do estresse, de proteínas associadas com a proteção de danos oxidativos e síntese e degradação de proteínas, além de proteínas do choque térmico (HSP17). No genótipo sensível, foi verificada redução da expressão dessas proteínas, sugerindo a associação destas com a resistência à seca na espécie (HAJHEIDARI et al., 2005).

Ao lado da análise metabólica em plantas utilizando abordagens por transcriptomas, *Western blot* ou técnicas de bioquímica clássica, a proteômica tem fornecido um crescente número de informações. Conforme JORRIN et al. (2007) a análise proteômica permite uma visão mais dinâmica do metabolismo,

capaz de permitir uma identificação acurada de mecanismos e vias metabólicas responsáveis pela percepção de estímulos internos e externos. Dessa forma, o conhecimento da dinâmica do proteoma vegetal pode permitir uma maior aproximação dos reais processos que ocorrem nas células, sob condições normais ou de estresses (FEY e LARSEN, 2001).

Tabela 1 – Análise proteômica de plantas relacionada a estresse abiótico, publicadas em 2006

Estresse	Espécie vegetal	Objeto de estudo	Referência	Principais características
Seca	<i>M. truncatula</i>	Plantas	Ali e Komatsu; 2006	Em resposta às condições de seca 10 proteínas aumentaram abundantemente e o nível de 2 proteínas diminuíram. Um fator de despolimerização da actina é o único das proteínas alvo induzidas pelo estresse hídrico, acumulação de proteínas foram analisadas sob varias condições diferentes de estresse.
		Dissecação tolerante ou não tolerante no estagio de semente	Boudet et al., 2006	Em frações de radículas estáveis no calor, a abundancia de 15 polipeptídios foram ligados com DT, dos quais 11 foram identificados como proteínas abundantes da embriogênese de grupos diferentes.
Calor	<i>Populus euphratica</i>	Folhas de plantas jovens	Ferreira et al., 2006	Acúmulo de proteína de folhas de plantas jovens submetidos a 42/37° C por 3 d em um fitotron foram determinadas através de 2D-PAGE, e um total de 45% de proteínas super/pouco reguladas foram detectadas. Análise MALDI-TOF / TOF, combinada com pesquisas em diferentes bases de dados, permitiu a identificação de 82% dos spots escolhidos.
	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Plantas transgênicas com fator de transcrição HsfA1 alterado	Mishra et al., 2002	Plantas transgênicas se tornaram extremamente sensíveis às temperaturas elevadas.
	<i>Trigo (T. aestivum)</i>	Cultivares de trigo tolerantes/sensíveis ao calor	Skylas et al., 2002	48 spots proteína exibiram expressão diferencial entre o controle e tratamento de choque térmico.

Tabela 1 – continuação

Estresse	Espécie vegetal	Objeto de estudo	Referência	Principais características
Seca/calor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Plantas	Rizhsky et al., 2004	454 transcritos são especificamente expressos em plantas durante uma combinação de seca e calor transcritos induzido durante a seca, por exemplo, os que codificam deidrinase, catalase e glicolato oxidase, bem como os induzidos durante estresse por temperatura: tioredoxina peroxidase, e ascorbato peroxidase, foram reprimidas durante a combinação de seca e de calor.
	<i>Tabaco (Nicotiana tabacum)</i>	Plantas	Rizhsky et al., 2002	
	<i>Grão-de-bico (Cicer arietinum L.)</i>	Genótipos tolerantes/resistentes a combinação do estresse seca e calor	Canci ; Toker, 2009	Dois genótipos de grão-de-bico, ACC 316 e ACC 317, foram selecionados com base na resistência a seca e ao calor (> 40° C) em condições de campo.

2- JUSTIFICATIVA

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma espécie encontrada praticamente em todos os estados brasileiros. Contudo, conforme BARROS et al., (2000), adapta-se melhor às condições ecológicas do litoral do Nordeste, onde se encontram extensas áreas cultivadas, principalmente nos Estados do Ceará (356 mil ha), Piauí (147 mil ha), Rio Grande do Norte (116 mil ha) e Maranhão (12 mil ha). Por ser amplamente cultivado no semi-árido nordestino, o cajueiro está exposto aos efeitos simultâneos de diferentes estresses abióticos característicos da região, como o déficit hídrico, salinidade dos solos e da água, temperaturas elevadas, além dos altos índices de radiação.

Por ser amplamente cultivado no semi-árido nordestino, o cajueiro está exposto aos efeitos simultâneos desses estresses. Esses fatores atuam de forma isolada e/ou simultânea sobre a cultura no campo, e podem explicar em parte o baixo rendimento de 220 kg/ha/ano atual da cultura (BARROS et al., 2000). Alguns estudos demonstraram que a salinidade, por exemplo, afeta as fases de germinação (VOIGT et al., 2008), crescimento inicial (FERREIRA-SILVA et al., 2008), enxertia (BEZERRA et al., 2002) e prefloração (CARNEIRO et al., 2007). Além disso, o estresse causa distúrbios metabólicos relacionados à mobilização de reservas (VOIGT et al., 2009) à fotossíntese (BEZERRA et al., 2007), ao metabolismo do nitrogênio (VIÉGAS et al., 2004) e à homeostase iônica (VIÉGAS et al., 2001).

Apesar desses estudos, ainda preliminares, os trabalhos voltados à compreensão das alterações induzidas por estresses abióticos no padrão de expressão de proteínas na espécie são inexistentes. Dessa forma, alguns questionamentos são extremamente pertinentes: (1) existe similaridade das alterações induzidas pelos estresses de seca e calor no proteoma da espécie? (2) qual desses fatores afeta mais o proteoma da planta? (3) o somatório das mudanças induzidas por seca e calor isolados, no proteoma do cajueiro, representa as alterações associadas à combinação dos estresses? (4) há mudanças na expressão protéica que são exclusivas a combinação desses estresses? (5) quais as principais proteínas induzidas/reprimidas em cada situação?

Essas perguntas só poderão ser respondidas utilizando abordagens experimentais capazes de contemplar os efeitos isolados e simultâneos dos fatores seca e calor. Dessa forma, o presente estudo se mostra apropriado à elucidação de tais questionamentos. A exposição das plantas aos efeitos isolados e combinados de seca e calor, associada à análise do padrão de expressão de proteínas por meio de mapas de eletroforese bidimensional (2D), com base na mudança na concentração (área e volume de *spots*), ponto isoelétrico e massa molecular, permite identificar mudanças no proteoma da espécie sob cada condição.

A análise dos resultados possibilitará a identificação de mudanças no proteoma do cajueiro associadas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e de temperaturas elevadas, dois dos principais estresses que afetam o desempenho vegetal no semi-árido brasileiro. Além disso, os resultados poderão auxiliar na identificação de vias metabólicas induzidas ou reprimidas sob condições dos respectivos estresses, contribuindo para o conhecimento acerca de possíveis mecanismos celulares relacionados com a aclimação da espécie ao ambiente semi-árido.

3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, G.M.; KOMATSU, S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. **J. Proteome Res.**, v. 5, p. 396-403, 2006.
- ARGYRIS, J.; TRUCO, M.J.; OCHOA, O.; KNAPP, S.J.; STILL, D.W.; LENSSEN, G.M.; SCHUT, J.W.; MICHELMORE, R.W.; BRADFORD, K.J. Quantitative trait loci associated with seed and seedling traits in *Lactuca*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 111, p. 1365-1376, 2005.
- APSE, M.P.; BLUMWALD, E. Na⁺ transport in plants. **FEBS Letters**, v.581, p.2247-2254, 2007
- BAE, M. S., CHO, E. J., CHOI, E.-Y. AND PARK, O. K. Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J*, v.. 36, p. 652-663, 2003.
- BARROS, L.M., CAVALCANTE, J.J, VASCONCELOS, J., PAIVA, J.R. Seleção de clones de cajueiro anão para o cultivo comercial no Estado do Ceará. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 11, p. 2197-2204. 2000.
- BEZERRA, M.A.; LACERDA, C.F.; FILHO, E.G.; ABREU, C.E.B.; PRISCO, J.T. Physiology of cashew plants grown under adverse conditions. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, p.449-461, 2007.
- BOROVSKII GB, STUPNIKOVA, I.V., ANTIPINA, A.A., DOWNS, C.A. Voinikov VK: Accumulation of dehydrin-like-proteins in the mitochondria of cold-treated plants. **J Plant Physiol**, v.156, p.797-800, 2000.
- BOUDET, J.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F.A.; ROGNIAUX, H. Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. **Plant Physiology**, v. 4, p. 1418-1436, 2006.
- BRAY , E. A. Classification of genes differentially expressed during water-deficit **stress** in *Arabidopsis thaliana* : an analysis using Microarray and differential expression data. **Annals of Botany**, v. 89, p. 803-811, 2002
- BRAY, E.A. Response to abiotic stresses. *In*: Gruissem, W. et al. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. p. 1158-1249, 2000.
- BRAY, E.A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1035-1040, 1993.
- CAMPBELL, S.A., CLOSE, T.J. Dehydrins: genes, proteins, and association with phenotypic traits. *New Phytol*, v.137, p.61-74, 1997.
- CANCI, H.; TOKER, C. Evaluation of yield criteria for drought and heat resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **J. Agronomy & Crop Science**, v. 195, Pages: 47-54, 2009
- CARNEIRO, P.T.; CAVALCANTI, M.L.F.; BRITO, M.E.B.; GOMES, A.H.S.; FERNANDES, P.D.; GHEYI, H.R. Sensibilidade do cajueiro anão precoce ao estresse salino na pré-floração. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2, p.150-155, 2007.
- CATTIVELLI, L., RIZZA, F., BADECK, F.W., MAZZUCOTELLI, E., MASTRANGELO, A.M., FRANCA, E., CATERINA MARE,C., TONDELLI , A., STANCA, M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, v. 105 p.1–14, 2008.
- CHAGAS, R.M. **Expressão de proteínas induzidas pelo NaCl em tecidos de plantas de erva sal (*Atriplex nummularia*)**. Monografia em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Ceará. 2004.

- CHANG, W.W.P., HUANG, L., SHEN, M., WEBSTER, C., BURLINGAME, A.L., ROBERTS, J.K.M.. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a lowoxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. **Plant Physiology** v.122, p.295–317, 2000.
- CHAVES, M.M., PEREIRA, J.S., MAROCO, J., RODRIGUES, M.L., RICARDO, P.P., OSÓRIO, M.L., CARVALHO, I., FARIA, T., PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field, photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, v. 89, p. 907-916, 2002
- CHENPING, X.; HUANG, B. Root proteomic responses to heat stress in two *Agrostis* grass species contrasting in heat tolerance. **Journal Experimental Botany**, v. 159, p. 4189-4194, 2008.
- CHEHAB,H.; MECHRI, B.; MARIEM, F.B. ; HAMMAMI, M.; BEN ELHADJ, S. BRAHAM, M.; Effect of different irrigation regimes on carbohydrate partitioning in leaves and wood of two table olive cultivars (*Olea europaea* L. cv. Meski and Picholine). **Agricultural water management**, v. 9 6, p. 293-298, 2009.
- CLARKE, S.M.; MUR, L.A.; WOOD, J.E.; SCOTT, I.M. Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, v. 38, p. 432–447, 2004
- CLOSE, T.J. Dehydrins: emergence of biochemical role of a family of plant dehydration proteins. **Physiol Plant**, v. 97, p. 795-803, 1996.
- CLOSE, T.J., KORTT, A.A., CHANDLER P.M. A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. **Plant Mol Biol**, v. 13, p.95–108, 1989.
- CUSHMAN, J.C.; BOHNERT, H.J. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 3, p. 117-124, 2000.
- DANYLUK, J., PERRON, A., HOUDE, M., LIMIN, A., FOWLER, B., BENHAMOU, N., SARHAN, F. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. **Plant Cell**, v.10, p. 623-638, 1998
- FERREIRA, S.; HJERNØ, K.; LARSEN, M.; WINGSLE, G.; LARSEN, P.; FEY, S.; ROEPSTORFF, P. Proteome profiling of *Populus euphratica* Oliv. upon heat stress. **Annals of Botany**, v. 98, p. 361-377, 2006.
- FERREIRA-SILVA, S.L. **Mecanismos de proteção oxidativa contra estresses isolados e combinados de seca, salinidade e temperatura elevada em cajueiro**. Tese de Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. 162p. 2008.
- FEY, S.J.; LARSEN, P.M. 2D or not 2D. **Current Opinion in Chemical Biology** v.5, p. 26-33, 2001.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia plantarum**, v. 119, p.355-364, 2003.
- FOYER, C.H. e NOCTOR, G. Tansley Review No. 112 Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytol**, v. 146, p. 359-388. 2000.
- GALLIE, D.R., LE, H., CALDWELL, C., BROWNING, K.S. Analysis of translation elongation factors from wheat during development and following heat shock. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 245, p. 295–300, 1998.
- GUO,Z., OU,W., LU,S., ZHONG, Q. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 828–836, 2006.

- HAJHEIDARI, M.; ABDOLLAHIAN-NOGHABI, M.; ASKARI, H.; HEIDARI, M.; SADEGHIAN, S.Y.; OBER, E.S.; et al. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. **Proteomics**, v. 5, p. 950-60, 2005.
- HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K. & BOHNERT, H. J. Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 51, p. 463-499, 2000.
- HEYNE, E.G.; BRUNSON, A.M. Genetic studies of heat and drought tolerance in maize. **Journal of American Society Agronomy**, v. 32, p. 803-814, 1940.
- HOESKSTRA, F.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends Plant Science**, v. 6, p. 431-438, 2001.
- IBA, K. ACCLIMATIVE RESPONSE TO TEMPERATURE STRESS IN HIGHER PLANTS: Approaches of Gene Engineering for Temperature Tolerance. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 53, p.225–45, 2002
- INGRAM, J, BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 377-403, 1996.
- JAGTAP, V., BHARGAVA, S., STREB, P., FEIERABEND, J. Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reactions in Sorghum bicolor (L.) Moench. **J Exp Bot**, v. 49, p. 1715–1721, 1998.
- JIANG, Y.; HUANG, B. Drought and heat stress injury to cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. **Crop Science**, v. 41, p. 436-442, 2001.
- JORRÍN, J.V., MALDONADO, A.M.; CASTILLEJO, M.A. Plant proteome analysis: a 2006 update. **Proteomics**, v. 7, p. 2947-2962, 2007.
- JUNG, E., HELLER, M., SANCHEZ, J. C. AND HOCHSTRASSER, D. F. Proteomics meets cell biology: the establishment of subcellular proteomes. **Electrophoresis** 21, 3369-3377, 2000.
- KAPLAN, F.; KOPKA, J.; HASKELL, D.W.; SCHILLER, C.; GATZKE, N.; SUNG, D.Y.; GUY, C.L. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 136, p. 4159-4168, 2004.
- KERSTEN, B., BURKLE, L., KUHN, E. J., GIAVALISCO, P., KONTHUR, Z., LUEKING, A., WALTER, G., EICKHOFF, H. AND SCHNEIDER, U. Large-scale plant proteomics. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 133-141, 2002.
- KISHOR, K.P.B., HONG, Z., MIAO, G.H., HU, C.A.A. e VERMA, D.P.S. Overexpression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increase proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiol**, v. 108, p. 1387-1394. 1995.
- KRUFT, V., EUBEL, H., JANSCH, L., WERHAHN, W. AND BRAUN, H. P. Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**, v. 127, p. 1694-1710, 2001.
- LABRA, M., GIANAZZA, E., WAITT, R., EBERINI, I., SOZZI A, GRASSI, F., AGRADI, E. Zea mays L. protein changes in response to potassium dichromate treatments. **Chemosphere**, v.62, p.1234–1244, 2006.
- LEE, D.G.; AHSAN, N.; LEE, S.H.; KANG, K.Y.; BAHK, J.D.; LEE, I.J. A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. **Proteomics**, v. 7, p. 3369-83, 2007.
- LEVITT, J. Responses of Plants to Environmental Stress, Vol II. Water, Radiation, Salt and Other Stresses. **Academic Press**, New York. 1980.

- LIMA, J. P. M. S. **Sincronia entre Catalases e Peroxidasas de Ascorbato na proteção contra danos oxidativos em folhas de feijão caupi expostas aos estresses hídrico e salino.** (Tese de Doutorado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007. 156 p.
- MANIVANNAN, P., ABDUL JALEEL, C., KISHOREKUMAR, A., SANKAR, B., SOMASUNDARAM, R., SRIDHARAN, R., PANNEERSELVAM, R. Changes in antioxidant metabolism of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. By propiconazole under water deficit stress. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.57, p. 69–74, 2007.
- MILLAR, A. H., SWEETLOVE, L. J., GIEGE, P. AND LEAVER, C. J. Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. **Plant Physiol.**, v. 127, p. 1711-1727, 2001.
- MISHRA, S.K., TRIPP, J., WINKELHAUS, S., TSCHERSCH, B., THERES, K., NOVER, L., SCHARF, K.D.. In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. **Genes and Development**, v. 16, p. 1555–1567, 2002.
- MITLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Plant Science**, v. 11, p. 1360-1385, 2006.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, **TRENDS in Plant Science**, v.7, nº 9, p.405-410, 2002.
- MITTLER, R. *et al.* Living under a 'dormant' canopy: a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama raetam*. **Plant J.**, v. 25, p.407–416, 2001
- MOFFAT, A.S. Finding new ways to protect drought-stricken plants. **Science**, v. 296, p. 1226-1229, 2002.
- MUNNS, R. e TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 59, p. 651–81, 2008.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p.239-250. 2002.
- PELTIER, J. B., YTTERBERG, J., LIBERLES, D. A., ROEPSTORFF, P. AND VAN WIJK, K. J. Identification of a 350 kDa ClpP protease complex with 10 different Clp isoforms in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 16318-16327, 2001.
- PELTIER, J. B., FRISO, G., KALUME, D. E., ROEPSTORFF, P., NILSSON, F., ADAMSKA, I. AND VAN WIJK, K. J. Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of luminal and peripheral thylakoid proteins. **Plant Cell**, v.12, p.319- 342, 2000.
- PERDOMO, P., MURPHY, J.A., BERKOWITZ, G.A. . Physiological changes associated with performance of Kentucky bluegrass cultivars during summer stress. **HortScience**, v. 31, p. 1182–1186, 1996.
- PINHEIRO, H.A., DAMATTA, F.M., CHAVES, A.R.M., LOUREIRO, M.E., DUCATTI, C. Drought tolerance is associated with root depth and stomatal control of water use in clones of *Colfea canephora*. **Ann Bot**, v.96p.101–8, 2005.
- PRIME, T., SHERRIER, D., MAHON, P., PACKMAN, L. AND DUPREE, P. A proteomic analysis of organelles from *Arabidopsis thaliana*. **Electrophoresis**, v. 21, p. 3488-3499, 2000.
- RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; DAVLETOVA, S.; MITLER, R. When defense pathways collide: the response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1683-1696, 2004.

- RIZHSKY, L., LIANG, H., MITTLER, R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1143-1151, 2002.
- ROSE, J.K.C.; BASHIR, S.; GIOVANONI, J.J.; JAHN, M.M.; SARAVANAN, R.S. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. **The Plant Journal**, v. 39, p. 715-733, 2004
- ROUQUIE, D., PELTIER, J. B., MARQUISMANSION, M., TOURNAIRE, C., DOUMAS, P. AND ROSSIGNOL, M. Construction of a directory of tobacco plasma membrane proteins by combined two-dimensional gel electrophoresis and protein sequencing. **Electrophoresis**, v. 18, p. 654-660, 1997.
- SARHAN, F., OUELLET, F., VAZQUEZ-TELLO, A. The wheat wcs120 gene family. a useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals. **Physiol Plant**, v. 101, p.439-445, 1997
- SAHNOUN, I.; DÉHAIS, P.; MONTAGU, M.V.; ROSSIGNOL, M.; ROUZÉ, P. PPMdb: a plant plasma membrane database. **J. Biotechnology**, v. 78, p. 235-246, 2000.
- SHAO, H.B.; CHU, L.Y.; JALEEL, C.A.; ZHAO, C.X. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **C R Biol.** v. 331, n. 3, p. 215-25, 2008.
- SKYLAS, D.J., CORDWELL, S.J., HAINS, P.G., LARSEN, M.R., BASSEAL, D.J., WALSH, B.J. Heat shock of wheat during grain filling: proteins associated with heat-tolerance. **Journal of Cereal Science**, v. 35, p. 175–188, 2002
- TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants. **Annals of Botany**, v. 91, p. 503-527, 2003.
- THOMASHOW, M.F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, v. 50, p. 571–599, 1999
- THOMASHOW, M.F. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. **Plant Physiology**, v. 118, p. 1-7, 1998.
- TOROK, Z.; GOLOUBONOFF, P.; HORVATH, I.; TSVELKOA, N.M.; GLATZ, A.; BALOUGH, G.; VARVASOVSKI, V.; LOS, D.A.; VIERLING, E.; CROWE, J. H.; VIGH, L. Synechocystis HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes refolding. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 3098-3103, 2001.
- TOUZET, P.; RICCARDI, F.; MORIN, C.; DAMERVAL, C.; HUET, J.C.;PERNOLLET, J.C.; ZIVY, D.; DEVIENNE, D. The maize two dimensional gel protein database: towards an integrated genome analysis program. **Theor. App. Genet.**, v. 93, p. 997-1005, 1996.
- TURCO, E., CLOSE, T.J., FENTON, R.D., RAGAZZI, A. Synthesis of dehydrin-like proteins in *Quercus ilex* L. and *Quercus cerris* L. seedlings subjected to water stress and infection with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.65, p.137-144, 2004.
- VAN WIJK, K. J. Challenges and prospects of plant proteomics. **Plant Physiol**, v. 126, p. 501-508, 2001.
- VICENT, D.; ZIVY, M. Plant Proteome responses to abiotic stress. **Plant Proteomics**, v.9, p. 346-364, 2007.
- VIÉGAS, R.A., SILVEIRA, J.A.G., SILVA, L. M.M.; VIÉGAS, P.R.A., QUEIROZ, J.E. e ROCHA, I.M.A. Redução assimilatória de nitrato em plantas de cajueiros cultivados em meio salinizado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 8, n. 2, p.189-195, 2004.

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

VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 579-620, 1991.

VOIGT, E.L.; ALMEIDA, T.D.; CHAGAS, R.M.; PONTE, L.F.A.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Source-sink regulation of cotyledonary reserve mobilization during cashew (*Anacardium occidentale*) seedling establishment under NaCl salinity. **Journal of Plant Physiology**. (Artigo in press). doi:10.1016/j.jplph.2008.02.008, 2009.

WAHID, A., CLOSE, T.J. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. **Biologia Plantarum**, v. 51, p. 104-109, 2007.

WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M. e FOOLAD, M.R. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, p. 199-223, 2007.

WANG, S.B., CHEN, F., SOMMERFELD, M. Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Planta**, v. 220, p.17-29, 2004.

WANG, W.; VINOCCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p. 1-14, 2003.

YAN S, ZHANG Q, TANG Z, SU W, SUN W. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. **Molecular Cellular Proteomics**, v. 5,p. 484-496, 2006.

YAN, S.; TANG, Z.; SU, W. Proteomic analysis of salt stress- responsive proteins in rice root. **Proteomics**, v. 5, p. 235-244, 2005

XU, C., SULLIVAN, J.H., GARRETT, W.M., CAPERNA, T.J., NATARAJAN, S. Impact of solar ultraviolet-B on the proteome in soybean lines differing in flavonoid contents. **Phytochemistry**, v. 69, p.38-48, 2008.

XIONG, L., LEE, H., ISHITANI, M., ZHU, J.K . Regulation of osmotic stressresponsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in Arabidopsis. **J Biol Chem**, v. 277, p. 8588-8596, 2002

XIONG, L. e ZHU, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant Cell Environment**, v. 25, n. 2, p. 131-139. 2002.

XIONG, L., ZHU, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress.**Plant Cell Environ**, v. 25, p. 131-139. 2001.

ZHAO, C.X.; SHAO, H.B.; CHU, L.Y. Aquaporin structure-function relationships: Water flow through plant living cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 62, p.163-172, 2008.

ZIVY, M.; VIENNE, D. Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. **Plant Mol. Biol.**, v. 44, p. 575-580, 2000.

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

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 53, p. 247-73, 2002.

4 - OBJETIVOS

4.1 - Objetivo geral

Caracterizar o padrão de expressão de proteínas induzidas e/ou reprimidas pelos estresses isolados e combinados de seca e temperatura elevada em folhas de cajueiro por meio de mapas de eletroforese bidimensional (2D).

4.2 - Objetivos específicos

1. Avaliar as mudanças das frações nitrogenadas: proteínas solúveis, proteínas insolúveis, aminoácidos livres totais, prolina e amônia em folhas de plântulas de cajueiro expostas a temperatura elevada;
2. Avaliar com base nas mudanças de concentração (área e volume de spots), associado com ponto isoelétrico/massa molecular, a expressão de proteínas de folhas de plântulas de cajueiro submetidas aos estresses isolados e combinados de seca e temperatura elevada;
3. Identificar por meio da seqüência N-terminal pelo menos duas proteínas importantes, em termos de alteração na expressão, envolvidas com o estresse de seca e temperatura elevada.

*C*apítulo I

Mudanças nas frações nitrogenadas em plantas de cajueiro expostas a temperatura elevada

1 - INTRODUÇÃO

As reações das plantas aos estresses ambientais são complexas e envolvem diferentes tipos de respostas bioquímicas e fisiológicas a fim de evitar, superar ou neutralizar os efeitos destes estresses (ANDRADE NETO et al., 2003; MUNNS e TESTER, 2008). A tolerância ou sensibilidade a condições estressantes particulares depende da adaptação bioquímica e genética das espécies, e diante disso muita atenção tem sido dada ao desenvolvimento de espécies adaptadas ou ajustadas às várias condições estressantes (DUBEY, 1999).

Os vários estresses ambientais podem causar importantes modificações metabólicas nas plantas que podem resultar no acúmulo ou depleção de certos metabólitos, alterações no comportamento de muitas enzimas e mudanças na síntese de proteínas, particularmente, àquelas sintetizadas *de novo* (KIRTIKARA et al., 1996; ANDRADE NETO et al., 2003). A síntese de determinadas proteínas em resposta a estresses têm sido bem documentada em diversas condições, tais como salinidade (DUBEY, 1997), déficit hídrico (KE et al., 2009), estresse osmótico (CARUSO et al., 2002) e choque térmico (WALTERS et al., 1998).

Numa condição de estresse salino, sugere-se que proteínas sintetizadas *de novo*, além dos aminoácidos e outros compostos nitrogenados, agem como componentes do mecanismo de tolerância à salinidade, atuando como solutos citoplasmáticos compatíveis ao ajustamento osmótico e proteção de estruturas celulares (RANI et al., 1988; HASEGAWA et al., 2000). Já sob estresse de temperatura elevada, ocorre um investimento metabólico maior na síntese de proteínas do choque térmico, as quais ajudam a estabilizar outras proteínas (COOPER et al., 1983; MUNNS, 2005).

Outra característica geral de plantas expostas a uma condição estressante, é o aumento no nível de aminoácidos, além de apresentarem alterações na síntese de várias proteínas relacionadas com a proteção dos danos causados pelos respectivos estresses (PIZA et al., 2003; CAVALCANTI et al., 2004). Numa situação de estresse hídrico, por exemplo, o acúmulo de proteínas (especialmente as solúveis) está relacionado com a manutenção de um estoque de nitrogênio para ser reutilizado ao término do estresse, além da síntese de solutos orgânicos

responsáveis pelo ajustamento osmótico celular (MANSOUR et al., 2000; PIZA et al., 2003).

As mudanças induzidas por estresses no balanço qualitativo/quantitativo das frações nitrogenadas em plantas, aparentemente depende do estresse e da espécie. Por exemplo, plantas de feijão expostas a salinidade apresentam intenso acúmulo de amônia e prolina livre (CARDOSO, 2000; SILVEIRA et al., 2001), enquanto em halófitas ocorre acúmulo preferencial de glicina-betaína sob condições de estresse (ARAÚJO et al., 2006). Em plantas jovens de cajueiro submetidas ao estresse salino ocorre significativo acúmulo de prolina, associado à forte restrição de crescimento (SILVEIRA et al., 2002; SILVEIRA et al., 2003), enquanto sob condições de temperaturas elevadas observa-se intenso aumento no conteúdo de proteínas solúveis (FERREIRA-SILVA, 2008).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as mudanças das frações nitrogenadas: proteínas solúveis, proteínas insolúveis, aminoácidos livres totais, prolina e amônia em folhas de plântulas de cajueiro expostas a temperatura elevada;

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Material vegetal e aplicação dos tratamentos

Sementes de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.), clone CCP 06, fornecidas pela EMBRAPA-CNPAT, foram desinfetadas com hipoclorito de sódio comercial 5% (v/v), lavadas com água destilada, e germinadas em vermiculita em vasos de 0,8 L, em casa de vegetação. Após o plantio, os vasos foram irrigados com água destilada até as plantas atingirem o estágio fisiológico de oito folhas (30 DPP). Para escolha do tratamento térmico a ser adotado no presente estudo, as plântulas foram inicialmente transferidas para câmara de crescimento e expostas a 25; 30; 35; 40; 45 e 50 °C por 12 horas, sob condições controladas de umidade relativa ($\pm 75\%$) e luminosidade ($\pm 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Experimento I).

A exposição das plântulas ao gradiente crescente de temperatura funcionou como pré-teste para escolha da temperatura a ser utilizada no ensaio. Como critério para escolha, foi adotado a intensidade térmica em que as plântulas apresentassem mudanças significativas no conteúdo de proteína solúvel foliar sem desencadear alterações morfológicas visíveis. Por esse critério, foram adotados os tratamentos térmicos de 25 °C (controle) e de 45 °C (estresse) no ensaio (Experimento II). Ao final de cada tratamento, as plântulas foram fotografadas, para registro de mudanças morfológicas induzidas pela temperatura, e em seguida separadas em raízes, caules e folhas liofilizadas, que foram congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80 °C para posterior análise.

2.2 - Determinações bioquímicas realizadas

2.2.1 - Extração de proteínas solúveis e insolúveis

Cerca de 50 mg de raízes, caules e folhas foram maceradas em presença de N₂ líquido até obtenção da farinha e em seguida foi adicionado 1 mL de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,8, contendo DTT 30mM, glicerol 20% e PEG 3%. Após maceração por 5 min o extrato foi centrifugado a 10.000 x g por 30 min em 4°C, o sobrenadante foi coletado e utilizado para determinação de proteínas solúveis totais e obtenção das eletroforeses. Para a determinação das proteínas

insolúveis totais, o precipitado (resultante da centrifugação supracitada) foi novamente macerado na presença de 2,0 mL de solução de Lise (Uréia 8M, Tiouréia 1M, CHAPS 2% e DTT 50mM) por 5 minutos e submetido a centrifugação a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e utilizado para a determinação das proteínas insolúveis totais (Figura 1).

2.2.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

Para as SDS-PAGE, alíquotas de 20µL de extrato protéico das folhas foram misturadas a 20µL de tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; glicerol; SDS 10% e azul de bromofenol) e 20µL da mistura foi aplicada em cada poço. Os géis apresentavam a seguinte constituição: 12,5% (*main gel*) e 5% (*stacking gel*), e as eletroforeses foram realizadas a 125V, 20mA e 10W, por cada gel, usando o tampão de corrida (Tris 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM e SDS 10%). Após a eletroforese, as proteínas foram coradas com *Comassie brilliant blue R-250* 0,025% em ácido acético 10% e metanol 40% durante 2h e, posteriormente, os géis foram descorados com ácido acético 10% e metanol 40% (LAEMMELI, 1970).

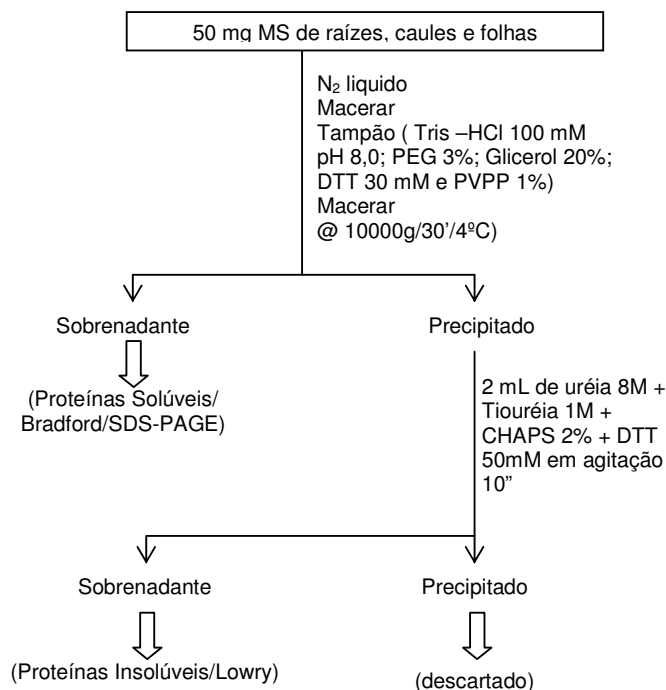


Figura 1 – Esquema da extração e fracionamento protéico dos tecidos de raízes, caules e folhas de plantas de cajueiro.

2.2.3 – Determinação das proteínas solúveis e insolúveis totais

A determinação do conteúdo de proteínas solúveis totais foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976). O método é baseado na mudança da coloração do reagente *Coomassie Brilliant blue* G-250 quando ligado a proteína e para a curva padrão utilizou-se a proteína albumina sérica bovina (BSA). Para a determinação, alíquotas de 10 µL do extrato protéico diluído 1/100 foram misturadas com 2,5 mL do reagente de Bradford, submetidas à leve agitação e incubados por aproximadamente 25 minutos a temperatura ambiente. Após isto, as amostras foram lidas a 595 nm e a concentração expressa em mg de proteína.g⁻¹ MS.

A determinação do conteúdo de proteínas insolúveis totais foi realizada com base no método proposto por Lowry (1951). O método se baseia numa seqüência de duas reações que ocorre entre as ligações peptídicas protéicas com o íon cu²⁺ e em seguida a formação de um complexo do ácido molibdato-tungsténico (presente no reagente de *Folin-Ciocalteu*) com os resíduos de triptofano e tirosina (abundantes nas proteínas insolúveis) resultando em um composto colorido que pode ter sua concentração estimada em espectrofotômetro a 750 nm. Assim, para as determinações, alíquotas de 1 mL do extrato foram transferidas para tubos de ensaio, adicionou-se 5 mL do reagente Folin C (Carbonato de sódio anidro 2% em NaOH 0,1N + sulfato de cobre 0,5% em de citrato de sódio 1%) e, após 10 minutos, 0,5 mL do Folin D (reagente de fenol 1N). Por fim, os tubos foram incubados a 25 °C por 30 minutos e então as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 750 nm. A concentração das proteínas insolúveis totais foi obtida comparando-se com a curva padrão de BSA e a concentração foi expressa em mg de proteína.g⁻¹ MS.

2.2.4 – Determinação dos aminoácidos livres totais (N α-amino livre)

Para as determinações de aminoácidos livres totais (AALT), cerca de 50 mg de massa fresca foram colocadas em tubos de ensaio rosqueáveis contendo 5 mL de água destilada e, em seguida, levada ao banho-maria a 37 °C durante 30

min. O sobrenadante foi recolhido e utilizado para a determinação dos AALT com base numa curva padrão de L-glutamina (PEOPLES et al., 1989).

2.2.5 – Determinação da prolina livre

A determinação da concentração de prolina livre (PRO) em raízes, caules e folhas de cajueiro foi realizada segundo a metodologia de Bates et al. (1973). Para tal, 50 mg de tecido vegetal foram colocadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de água deionizada, fervidas a 100°C por 30 minutos e, então, centrifugadas a 10.000 x g por 15 min. O sobrenadante foi coletado e a concentração de prolina livre foi estimada com base em curva padrão de L-prolina e expressa em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS.

2.2.6 – Determinação de amônio livre

A determinação das concentrações de amônio livre (NH_4^+) foi realizada conforme metodologia descrita por Weatherburn (1967), onde cerca de 50 mg de tecido vegetal foram pesadas, colocadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de água deionizada e fervidas a 100°C por 30 minutos. Após a fervura, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 15 min e o sobrenadante foi coletado. A concentração de amônio livre foi estimada com base em curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de uma solução padrão de sulfato de amônio e expressa em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS.

2.3 – Delineamento estatístico e análise dos dados

O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. No experimento I as plântulas foram expostas aos tratamentos 25; 30; 35; 40; 45 e 50 °C e no experimento II aos tratamentos 25 °C (controle) e 45 °C (estresse). Cada tratamento foi representado por três repetições independentes, consistindo em um vaso contendo uma planta. Os dados foram submetidos ao teste F a 5% de significância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Aspectos morfológicos e concentração de proteínas (pré-teste)

As plantas de cajueiro anão precoce após serem submetidas às temperaturas entre 25 °C a 45 °C por 12 horas não apresentaram alterações morfológicas visíveis. Entretanto, quando submetidas a 50 °C foram registrados perda de turgor e presença de pontos cloróticos no limbo foliar, a partir de nove horas de exposição (Figura 2). Segundo Rizhsky et al. (2002), como resposta ao aumento da temperatura, as plantas podem apresentar aumento na respiração, na condutância estomática e na temperatura da superfície foliar, que levaria a uma redução no turgor em consequência da alteração do potencial hídrico foliar.

Como consequência do aumento da temperatura, também foi observada a elevação da concentração de proteínas solúveis. Quando se comparou os tratamentos 30 e 40 °C, com o controle, foram observados incrementos no conteúdo de proteínas solúveis de 28%, enquanto que em relação os tratamentos 45 e 50°C registraram-se aumentos de 65% e 100%, respectivamente (Figura 3A). A elevação da temperatura pode ocasionar uma solubilização das proteínas insolúveis, tornando-as solúveis, ou uma síntese *de novo* de proteínas em resposta ao estresse (LEE et al., 2000; CAVALCANTI et al., 2004).

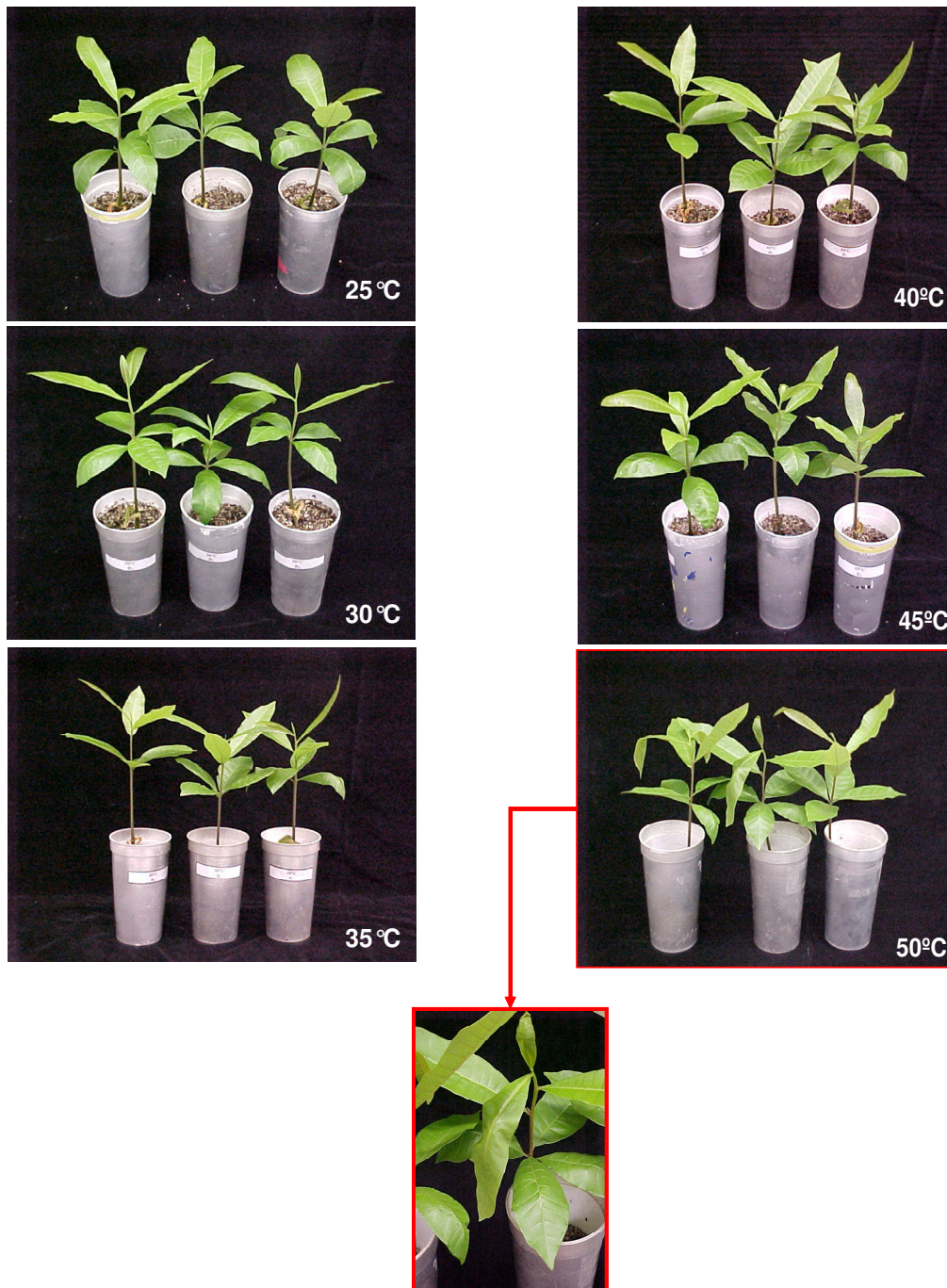


Figura 2 – Aspecto visual das plantas de cajueiro submetidas às temperaturas de 25; 30; 35; 40; 45 e 50 °C, durante 12 horas. O detalhe demonstra a perda de turgor das folhas e do segmento apical do caule ocorrido a partir das 9 horas de exposição das plantas ao tratamento de 50 °C.

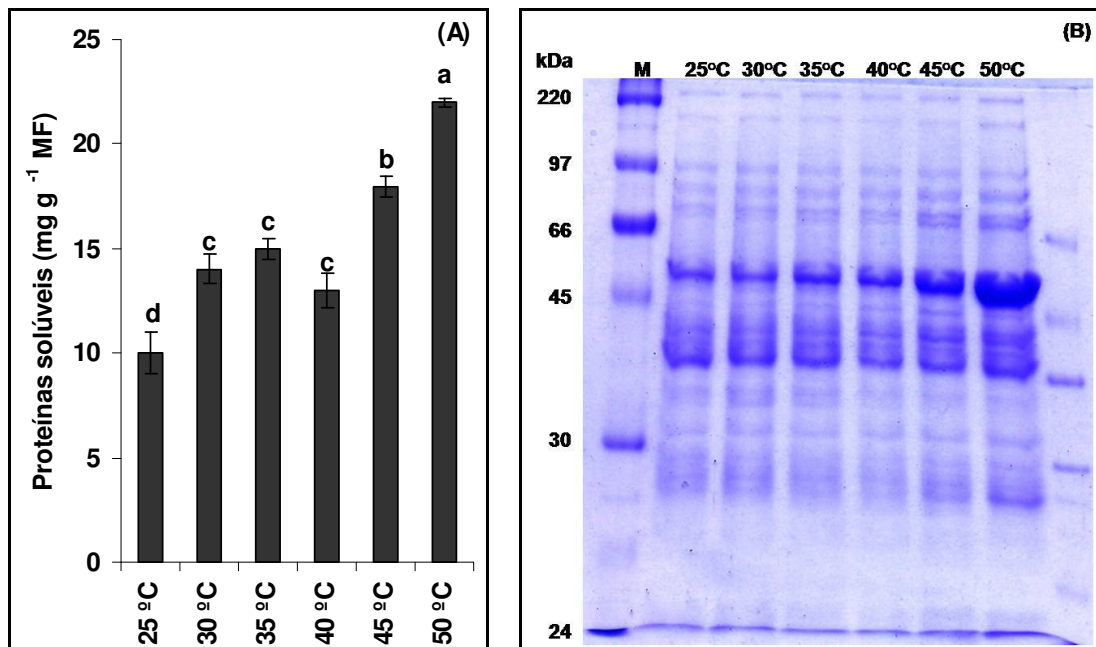


Figura 3 - Mudanças no conteúdo de proteína solúvel (A) e no perfil eletroforético (SDS-PAGE) de proteínas foliares (B) de plântulas de cajueiro após exposição às temperaturas de 25; 30; 35; 40; 45 e 50 °C durante 12 horas. Na eletroforese foi aplicado 20 µL de extrato protéico em cada poço.

A análise do perfil eletroforético (SDS-PAGE) corroborou com os resultados obtidos na quantificação das proteínas solúveis, onde pode-se observar um aumento na intensidade das bandas protéicas em resposta ao aumento da temperatura, principalmente daquelas com massa próxima à 50kDa (Figura 3B). A Rubisco é um complexo protéico de 16 subunidades, sendo oito menores de 14kDa e oito maiores de 53kDa (SPREMULLI, 2000). Esta proteína é a mais abundante na espécie vegetal e possui extrema importância na captação de CO₂ durante o processo fotossintético (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Sob temperaturas elevadas pode ocorrer uma maior solubilização do oxigênio nos tecidos do mesófilo e conseqüentemente favorecimento da atividade oxigenase da Rubisco (SHARKEY, 2005). Assim, o aumento da concentração da Rubisco, em resposta ao incremento da temperatura, aqui observado, pode refletir um mecanismo para a recuperação da capacidade fotossintética sob condições de calor (JENSEN, 2000). Esse aumento pode, ainda, indicar ocorrência de desnaturação e perda de atividade dessa enzima pelo calor, o que justificaria a

síntese dessa proteína para compensar perdas da eficiência fotossintética (FELLER et al., 2008).

3.2 - Proteínas solúveis e insolúveis em resposta à temperatura elevada

As proteínas são encontradas em todas as partes da célula vegetal e são fundamentais sob todos os aspectos estruturais e funcionais da célula (BRAY, 2000). Assim, mudanças nos teores de proteínas registrados em plantas submetidas às condições de estresse, podem representar um grande dano ou um mecanismo de aclimatação para o crescimento e desenvolvimento vegetal (PARIDA ; DAS, 2005; SILVEIRA et al., 2003). Neste estudo, foram verificadas alterações no conteúdo de proteína solúvel e insolúvel em tecidos de raízes, caules e folhas das plantas de cajueiro expostas a 45 °C por 12 horas (Figura 4A e B).

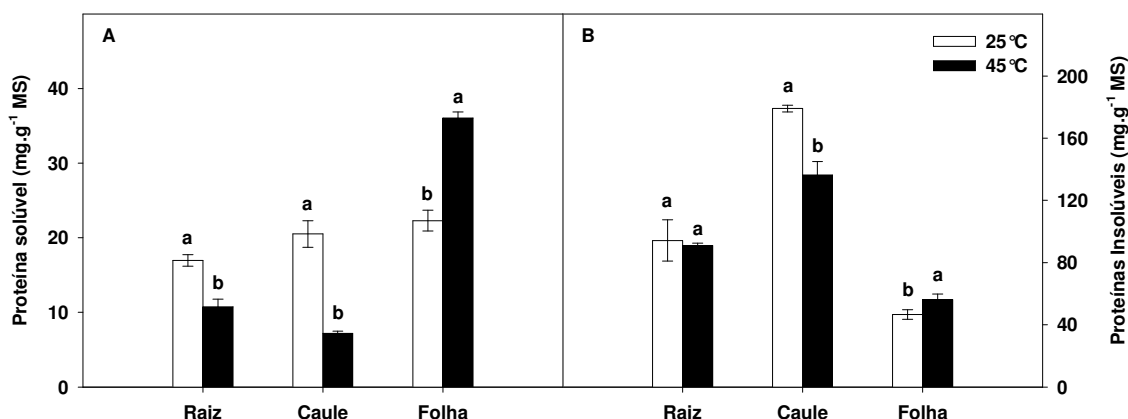


Figura 4 - Proteínas solúveis (A) e insolúveis (B) em tecidos de raízes, caules e folhas de plantas de cajueiro submetidas a 25 °C e 45 °C por 12 horas. Letras diferentes nas colunas, entre os órgãos, representam diferença significativa pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Comparando as plantas do tratamento controle (25 °C) com àquelas expostas a 45 °C, o teor de proteínas solúveis decresceu 37% e 65% nas raízes e no caule, respectivamente, enquanto em folhas ocorreu um aumento em torno de 40% em respostas a 45 °C (Figura 4A). A resposta exibida pelas plantas expostas

a 45 °C com relação aos teores de proteína solúvel nas partes estudadas representa uma intensa mobilização de compostos nitrogenados em resposta ao estresse térmico. Segundo Tester e Davenport (2003), sob condições de estresse, a síntese de proteínas pode ser aumentada visando à estabilização de membranas celulares, ou ainda, a sinalização atribuída ao estímulo do estresse.

Por outro lado, o aumento brusco da concentração de proteínas solúveis em plantas expostas a estresses pode refletir um aumento da solubilização de inúmeras proteínas e não um aumento de síntese protéica (CAVALCANTI et al., 2004). No geral, proteínas insolúveis estão presentes associadas aos sistemas de membranas, a organelas e ao núcleo, e que com o aumento da temperatura do ambiente passam a desnaturar e então formar complexos solúveis com outras proteínas (LEE et al., 2000). No presente estudo, ocorreu decréscimos na concentração de proteínas insolúveis nas raízes e no caule, em torno de 5% e 25%, respectivamente, em respostas ao tratamento de 45 °C, enquanto nas folhas a concentração dessa fração aumentou cerca de 20% (Figura 4B).

As folhas são os órgãos fotossintéticos e possuem extrema importância para o desenvolvimento vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2004). A elevação da temperatura intensifica a atividade de cadeias transportadoras de elétrons. Nessas condições, o aumento do conteúdo de proteínas membranares (insolúveis), tais como aquelas constituintes da CET cloroplástica, se faz necessário para comportar o maior fluxo de elétrons e para auxiliar na dissipação de calor (JIANG e HUANG, 2001; ASHAN et al., 2008). O incremento das proteínas insolúveis no tecido foliar das plantas de cajueiro submetidas à temperatura elevada, observado no presente estudo, pode representar um reflexo do aumento da expressão de HSPs (*“heat shock proteins”*) de baixo peso molecular, freqüentemente relacionadas com a proteção ao estresse térmico *in vivo*, as quais são cerca de 1% das proteínas acumuladas em folhas de plantas expostas ao estresse térmico (CUESTA et al., 2000; BASHA et al., 2004; CASHIKAR et al., 2005; HASLBECK et al., 2005).

3.3 – Alterações nos compostos nitrogenados em resposta à alta temperatura

Foram observadas mudanças significativas nos conteúdos das frações nitrogenadas em tecidos de raízes, caules e folhas das plântulas de cajueiro em resposta ao aumento da temperatura (Figura 5A-D). As plântulas expostas ao tratamento de 45 °C apresentaram aumento da concentração de aminoácidos livres totais de 9%, 12% e 5% em tecidos de raízes, caule e folhas, respectivamente, comparados aos respectivos controles (Figura 5B). O metabolismo de aminoácidos livres em plantas submetidas a estresses é intensamente afetado, podendo refletir em alguns casos o efeito dos estresses na síntese protéica ou, ainda, representar um aumento da atividade de proteólise celular (SILVEIRA et al., 2002). Em plantas de feijão caupi expostas ao excesso de calor ocorreu um aumento de 1,5 vezes na concentração de aminoácidos livres totais (RANDALL et al., 1990).

Sob condições de estresses, particularmente altas temperaturas, as plantas apresentam distúrbios no metabolismo de compostos nitrogenado, principalmente de aminoácidos (SILVEIRA et al., 2003). O conteúdo de prolina livre em todas as frações vegetais estudadas foi intensamente aumentado nas plântulas submetidas ao estresse térmico (Figura 5C). Nas plântulas expostas a 45 °C o teor de prolina apresentou acréscimos de 100, 300 e 130% em tecidos de raízes, caules e folhas respectivamente, comparado aos respectivos controles (Figura 5C). O acúmulo de prolina livre em resposta ao calor pode ser devido a um distúrbio no *status* hídrico do tecido foliar, visto que a desidratação induzida pelo estresse térmico pode levar ao acúmulo de prolina livre (LACERDA et al., 2001; ASHRAF e FOOLAD, 2006).

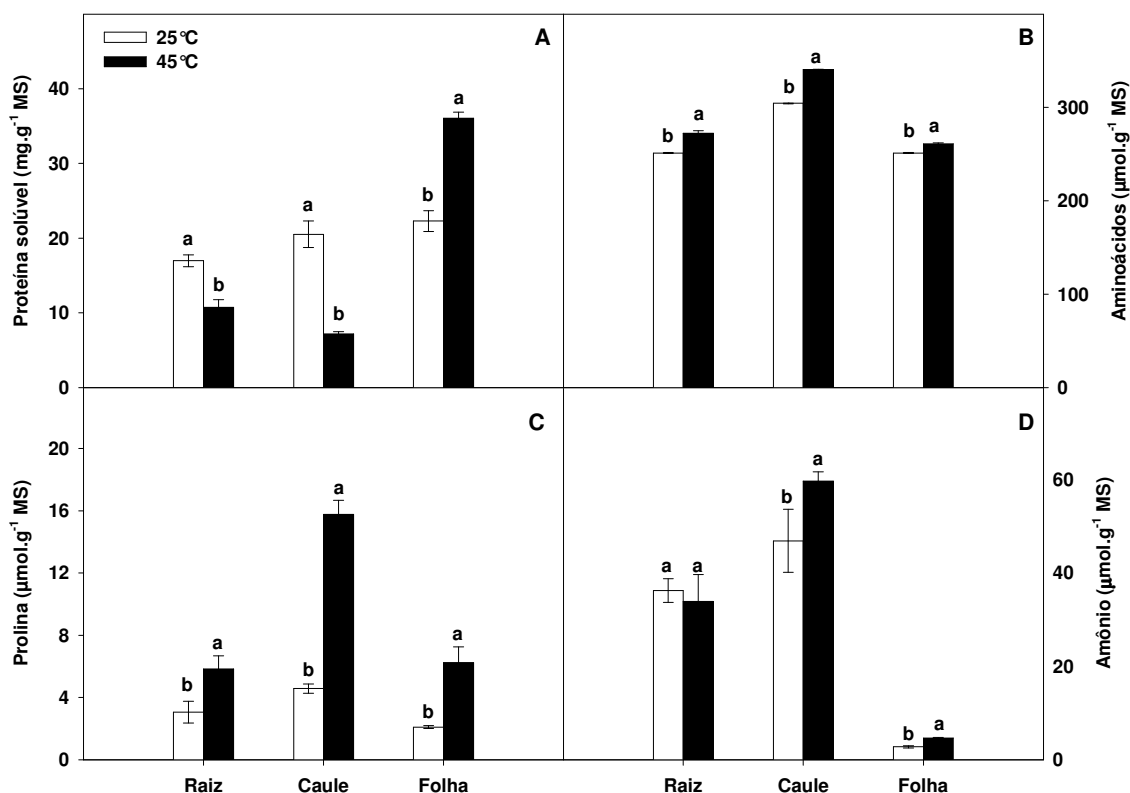


Figura 5 - Proteínas solúveis (A), aminoácidos livres totais (B), prolina livre (C) e amônia (D) em tecidos de raízes, caules e folhas de plantas de cajueiro submetidas a 25 °C e 45 °C por 12 horas. Letras diferentes nas colunas, dentro de cada órgão, representam diferença significativa pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Apesar do amplo questionamento do papel da prolina nas respostas de plantas a estresses, tem sido proposto que este aminoácido pode funcionar como de diferentes formas na proteção do metabolismo celular, incluindo a estabilização de macromolecular e membranas, como osmosoluto, equilíbrio do pH citosólico e ainda no tamponamento redox das células (VERBRUGGEN e HERMANS, 2008). Por outro lado, o aumento do teor de prolina em folhas de plântulas de cajueiro expostas a salinidade, ocorreu associado ao incremento de atividade proteolítica, indicando que o acúmulo desse soluto na espécie pode estar mais relacionado a distúrbios metabólicos induzidos pelo sal do que a proteção de células e tecidos (.SILVEIRA et al., 2003).

Comparando-se as concentrações de amônia nas frações vegetais das plantas submetidas a 25°C e 45°C, respectivamente, foi evidente que houve um

incremento deste íon nas folhas em torno de 60%. No caule das plantas expostas a 45°C em relação às do controle, foi observada uma elevação de aproximadamente 30%, entretanto nas raízes, destas mesmas plantas, houve um decréscimo de cerca de 10% (Figura 5D). O acúmulo do íon amônia pode ser originado do catabolismo de aminoácidos na senescência dos tecidos, da degradação de proteínas em aminoácidos (MATTSSON e SCHJOERRING, 2003) ou ainda liberados da fotorrespiração de mitocôndrias (LEEGOOD et al., 1996).

Num contexto geral, durante o estresse térmico a redução do íon amônia, das proteínas solúveis e insolúveis e ainda o aumento dos aminoácidos livres totais nas raízes podem representar uma mobilização dos compostos nitrogenados para os órgãos fotossinteticamente ativos (folhas) visando uma proteção do aparato fotossintético e, assim, a manutenção da fotossíntese (HIKOSAKA et al., 2006; MULLER et al., 2005). A redução da concentração das proteínas solúveis e insolúveis nos caules e raízes pode indicar a ocorrência de proteólise nestes órgãos (FELLER et al., 2008). Essa hipótese é reforçada pelo aumento da liberação de amônia observado nesses órgãos, sugerindo, ainda, a liberação de aminoácidos protéicos desses tecidos com retranslocação desses solutos para folhas, onde seriam utilizados para a síntese protéica nesse órgão.

4 - CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o aumento do conteúdo de proteínas em folhas de cajueiro, induzido pelo calor, está relacionado com a mobilização de reservas nitrogenadas a partir de raízes e caules e/ou com a síntese protéica no tecido foliar. Indicam ainda, que o caule possui maior contribuição como fonte de reservas nitrogenadas se comparado com a raíz.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE NETO, R.C.; GÓES, G.B.; QUEIROGA, R.C.F.; NUNES, G.H.S.; MENDEIROS, J. F.; ARAÚJO, W.B.M. **Efeito de níveis de salinidade e híbridos de melão sobre a germinação de sementes e o crescimento inicial da plântula**. Mossoró: ESAM, 2003.
- ASHAN, N., LEE, D.G., LEE, K.W., ALAM, I., LEE, S.H., BAHK, J.D., LEE, H.B. Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic Approach. **Plant Physiology and Biochemistry** v. 46, p. 1062–1070, 2008.
- ARAÚJO, S. A.M. ; SILVEIRA, J. A.G. ; ALMEIDA, T. D.; ROCHA, I. M.A. ; MORAIS, D. L. E VIÉGAS, R. A. Salinity tolerance of halophyte *Atriplex nummularia* L. grown under increasing NaCl levels. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.10, n.4, p.848-854, 2006.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, p. 1-11, 2006.
- BAETHGEN, W.E.; ALLEN, M.M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digest. **Community Soil Science and Plant Annals**, v. 20, n. 10. p. 961-969, 1979.
- BASHA, E., LEE, G.J., BRECI, L.A., HAUSRATH, A.C., BUAN, N.R., GIESE, K.C., VIERLING, E. The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions, **J. Biol.Chem.** v.279, 7566–7575, 2004.
- BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAY, E.A. Response to abiotic stresses. *In*: Grissem, W. et al. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists. p. 1158-1249, 2000.
- CARDOSO, B.B. **Efeitos comparativos da salinidade sobre o metabolismo do nitrogênio em folhas e nódulos de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] inoculada com *Bradyrhizobium sp.*** Tese de Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. 2000.
- CARUSO, A.; MORABITO, D. , DELMOTTE, F. , KAHLEM, G. , CARPIN, S. Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 40 , p. 1033–1042, 2002.
- CASHIKAR, A.G., DUENNWALD, M.L. E LINDQUIST, S.L. A Chaperone Pathway in Protein Disaggregation: HSP26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by HSP104. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 90-98, 2005
- CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIÉGAS, R. A. & SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytol.**, v. 163, p. 563 – 571. 2004.
- COOPER, P.; HO, T.H.D. Heat shock proteins in maize. **Plant Physiol**, v. 71, p. 215-222, 1983.
- CUESTA, R., LAROIA, G., SCHNEIDER, R.J. Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes, **Genes Dev.** , v.14, p. 1460–1470, 2000.

- DUBEY, R.S. Protein synthesis under stressful conditions. *In*: PESSARAKLI, M. **Handbook of plant and crop stress**. p. 365-398. New York: CRC Press, 1999.
- DUBEY, R.S. Nitrogen metabolism in plants under salt stress. *In*: JAIWAL, P.K., SINGH, R.P., GULATI, A., eds. *Strategies for improving salt tolerance in higher plants*. New Delhi: IBH Publication, p.129-158, 1997.
- FELLER, U.; ANDERS, I.; DEMIREVSKA, K. Degradation of rubisco and other chloroplast proteins under abiotic stress. **Gen. Appl. Plant Physiology**, v. 34, n. 1-2, p. 5-18, 2008.
- FERREIRA-SILVA, S.L. **Mecanismos de proteção oxidativa contra estresses isolados e combinados de seca, salinidade e temperatura elevada em cajueiro**. Tese de Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. 162p. 2008.
- HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K. & BOHNERT, H. J. Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 51, p. 463-499, 2000.
- HASLBECK, M., MIESS, A., STROMER, T., WALTER, S., BUCHNER, J. Disassembling Protein Aggregates in the Yeast Cytosol: the cooperation of HSP26 with SSA1 and HSP104. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, No. 25, p. 23861–23868, 2005.
- HIKOSAKA, K.; ISHIKAWA, K.; BORJIGIDAI, A.; MULLER, O.; ONODA, Y. Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 2, p. 291-302, 2006.
- KE, Y., HAN, G., HE, H., LI, J. Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 379, p. 133–138, 2009.
- KIRTIKARA, K; TALBOT, D. Alteration in protein accumulation, gene expression and ascorbate-glutathione pathway in tomato (*Lycopersicon esculentum*) under paraquat and ozone stress. **Journal Plant Physiology**, v. 148, p. 742-760, 1996.
- JENSEN, R.G. Activation of Rubisco regulates photosynthesis at high temperature and CO₂. **PNAS**, v. 97, n.24, p. 12937-12938, 2000.
- JIANG, Y.; HUANG, B. Drought and heat stress injury to cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. **Crop Science**, v. 41, p. 436-442, 2001.
- LACERDA, C. F.; CAMBRAIA, J.; CANO, M. A. O. e RUIZ, H. A. **Crescimento da planta e acúmulo e distribuição de solutos em dois genótipos de sorgo, submetidos a estresse com NaCl**. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* [online]. 2001, v. 13, n. 3, pp. 270-284.,2001
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEE, G. J.; VIERLING, E. A Small Heat Shock Protein Cooperates with Heat Shock Protein 70 Systems to Reactivate a Heat-Denatured Protein1. **Plant Physiology**, Vol. 122, pp. 189–197,2000.
- LEEGOOD, R.C., VON CAEMMERER S., OSMOND, C.B. Metabolite transport and photosynthetic regulation in C4 and CAM plants. *In* DT Dennis, DH Turpin, DD Layzell, DK Lefebvre, eds, **Plant Metabolism**. Longman, London, pp 341–369, 1996.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol. Chem.**, v, 193, p. 265-275, 1951
- MANSOUR, M.M.F. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. **Biologia Plantarum**, v. 43, p. 491-500, 2000.

- MATTSSON, M. E SCHJOERRING, J.K. Senescence-induced changes in apoplastic and bulk tissue ammonia concentrations of ryegrass leaves, **New Phytol.** v.160, pp. 489–499, 2003.
- MULLER, O.; HIKOSAKA, K.; HIROSE, T. Seasonal changes in light and temperature affect the balance between light harvesting and light utilisation components of photosynthesis in an evergreen understory shrub. **Oecologia**, v. 143, p. 501-508, 2005.
- MUNNS, R. e TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 59, p. 651–81, 2008.
- MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, v. 167, p.645–663, 2005.
- PEOPLES, M.B.; FAIZAH, A.W.; REAKASEM, B.; HERRIDGE, D.F. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field.** Canberra: Australian Center of Agricultural Research, 79p. 1989.
- PARIDA, A.K., DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324-349, 2005.
- PIZA, I.M.T.; LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G. Atividade de peroxidase e concentrações de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 4, p. 361-366, 2003.
- RANDALL, R., MAYER, J., CHERRY, H. E RHODES, D. Effects of Heat Shock on Amino Acid Metabolism of Cowpea Cells. **Plant Physiol.** v.94, p.796-810, 1990.
- RANI, M. Influence of salinity on metabolic status of protein and aminoacids during germination and early seedlings stages of rice. PhD, dissertation, submitted to Banaras, Hindu University, India, 1998: 180-199.
- RIZHSKY, L., LIANG, H., MITTLER, R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1143-1151, 2002.
- SHARKEY, T.D. Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. **Plant Cell Environ.**, v. 28, p. 269–277. 2005.
- SILVEIRA, J.A.G, MELO, A.B., VIÉGAS, R.A., OLIVEIRA, J.T.A. Salt-induced effects on the nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, p. 171-179, 2001.
- SILVEIRA, J.A.G.; VIÉGAS, R.A.; ROCHA, I.M.A.; MOREIRA, A.C.O.M.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 115-123, 2003.
- SPREMULLI, L. Protein synthesis, Assembly and Degradation. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants.** Rockville: American Society of Plant Physiologists. Pp. 412-454, 2000
- TAIZ, L. ; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3ª ed.. Porto Alegre: Artmerd, 2004, p.719
- TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants. **Annals of Botany**, v. 91, p. 503-527, 2003.
- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v.35, p. 1438-2199, 2008.

VIEGAS, R. A. E SILVEIRA, J.A.G. Nitrate reductase activity and proline accumulation in cashew (*Anacardium occidentale L.*) in response to salt (NaCl) shock. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 11, p. 21-28, 1999.

WATERS, E.R.; LEE, G.J. e VIERLING, E. Evolution, structure and function of heat shock proteins in plants. **J. Experimental Botany**, v.47, p.325-338, 1998.

WEATHERBURN, M.W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 971-974, 1967.

*C*apítulo II

Modulação da expressão de proteínas sob efeitos isolados e combinados de seca e temperatura elevada em folhas de cajueiro

1- INTRODUÇÃO

A proteômica pode ser definida como o conjunto de metodologias analíticas, sistemáticas, empregadas para caracterizar quantitativamente e/ou qualitativamente um proteoma, conjunto de proteínas complementares de um genoma (PANDEY e MANN, 2000; ONG e MANN, 2005). Os primeiros estudos proteômicos em plantas, submetidas a estresses abióticos, foram publicados no final dos anos 80 e embora muitas proteínas ainda permanecessem anônimas, estes estudos já vislumbravam o impacto dos estresses sobre a síntese *de novo* de proteínas, além dos efeitos destes nas diferentes frações das membranas celulares vegetais (HURKMAN e TANAKA, 1987; HURKMAN et al., 1988).

No final dos anos 90, com o uso de técnicas emergentes de identificação de proteínas, foi possível estabelecer a primeira lista de proteínas induzidas por estresses abióticos (ZIVY e VIENNE, 2000; KERSTEN et al., 2002; PARK, 2004). Com o aperfeiçoamento das técnicas já existentes pode-se investir em novas perspectivas, visando elucidar as alterações no metabolismo protéico de plantas em resposta a estresses (CHANG et al., 2000). Neste contexto, a criação de mapas quantitativos e qualitativos de proteínas expressas por plantas quando submetidas a uma determinada condição de estresse, é uma abordagem que permite a análise das modificações pós-transducionais, do *turnover* e ainda da taxa de migração protéica pelos diversos compartimentos celulares vegetais (WAHID et al., 2007).

Vários estresses abióticos compartilham conseqüências semelhantes a nível celular e isso pode ser reflexo do fato destes não ocorrem isoladamente, e sim de forma simultânea (MITTLER et al., 2001; MITTLER, 2006). Um bom exemplo são as condições de déficit hídrico (seca) e de temperaturas elevadas (calor), as quais são condições ambientais que ocorrem simultaneamente no ambiente, especialmente em regiões de climas áridos e semi-áridos, e podem levar à mudanças significativas nas relações hídricas da planta (MOFFAT, 2002; RIZHSKY et al., 2002).

Apesar dos estresses de seca e calor tenham sido amplamente estudados isoladamente (VIERLING, 1991; INGRAM; BARTELS, 1996; SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1996; QUEITSCH et al., 2000), relativamente pouco

se sabe sobre como a combinação destes estresses afeta o metabolismo vegetal. Estudos com plantas de tabaco e *Arabidopsis* submetidas aos estresses de seca e calor simultaneamente, mostraram que a combinação destes estresses implica numa resposta distinta daquela que é registrada quando os estresses são aplicados isoladamente (RIZHSKY et al., 2002; RIZHSKY et al., 2004). Conforme RIZHSKY et al. (2002), o nível de uma série de transcritos em plantas de tabaco submetidas aos estresses de seca ou de calor foi elevado, no entanto, a combinação destes fatores levou a uma redução dos transcritos, restando apenas um pequeno número de transcritos que foram especificamente expressos em resposta a combinação dos estresses.

No presente capítulo, foram avaliadas além das mudanças no conteúdo de proteínas em folhas de plântulas submetidas aos estresses de temperatura, também foram mensurados os conteúdos de proteínas em folhas de plântulas submetidas aos estresses de seca e seca + calor, bem como avaliados os perfis protéicos de cada um dos tratamentos, com base na concentração (área e volume de spots), associado ao ponto isoeletrico/massa molecular, resultando na identificação de duas proteínas envolvidas com a aclimatação aos respectivos estresses por meio da seqüência N-terminal.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Material vegetal e aplicação dos tratamentos

Sementes de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.), clone CCP 06, fornecidas pela EMBRAPA-CNPAT, foram esterilizadas em hipoclorito de sódio 5% (v/v) e semeadas em vasos de 2,0 L, contendo vermiculita, sob condições de casa de vegetação. Durante as fases de germinação e crescimento inicial das plântulas a umidade do substrato foi mantida próxima da capacidade de campo, por irrigações freqüentes com água destilada. Após 35 dias plântulas homogêneas, com 8 folhas expandidas, foram utilizadas no experimento.

Durante o ensaio as plântulas foram mantidas sob condições controle, irrigadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) diluída 1/4, ou submetidas à seca por suspensão da rega tempo suficiente para induzir restrição estomática

superior a 80%, por no mínimo 10 dias. Com base nesse critério, as plântulas foram submetidas à suspensão da rega por 20 dias, momento em que foram expostas aos tratamentos de temperatura. Para aplicação dos tratamentos de temperatura, as plântulas controle ou pré-expostas à seca foram transferidas para câmara B.O.D. (CIENITEC/modelo 708) e submetidas a 25 °C ou 45 °C em condições controladas de luminosidade ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e umidade relativa ($65 \pm 5\%$), por um fotoperíodo de 12 h.

Para aplicação dos tratamentos as plântulas foram transferidas para a câmara no final da tarde (18:00 h), onde permaneceram por 12 h no escuro em temperatura ambiente. No início do dia seguinte (06:00 h) foram submetidas aos tratamentos: controle (Irrigadas + 25 °C por 12 h); seca (20 dias de suspensão da rega + 25 °C por 12 h); calor (Irrigadas + 45 °C por 12 h) e seca + calor (20 dias de suspensão da rega + 45 °C por 12 h). Ao final do fotoperíodo (18:00) as plântulas foram coletadas e as folhas foram destacadas, imediatamente congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80°C para posterior análises.

2.2- Determinação de proteínas solúveis

A determinação do conteúdo de proteínas solúveis totais foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976). O método é baseado na mudança da coloração do reagente *Coomassie Brilliant blue* G-250 quando ligado a proteína e para a curva padrão utilizou-se a proteína albumina sérica bovina (BSA). Para a determinação, alíquotas de 10 μL do extrato protéico diluído foram misturadas com 2,5 mL do reagente de Bradford, submetidas à leve agitação e incubados por aproximadamente 25 minutos a temperatura ambiente. Após isto, as amostras foram lidas a 595 nm e a concentração expressa em $\text{mg de proteína.g}^{-1} \text{MS}$.

2.3 – Preparo das amostras para eletroforese bidimensional

Amostras de folhas congeladas (200 mg) foram maceradas na presença de N₂ líquido por 5 minutos, seguido da adição de 3 mL de meio de extração (tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,8, contendo DTT 30mM, glicerol 20%, PEG 3% e PVPP

1%), e maceração por mais 5 minutos. O macerado foi então centrifugado a 14.000 x g por 30 min a 4°C e o sobrenadante recolhido (Figura 6).

As proteínas do sobrenadante foram submetidas a precipitação pela mistura desse meio com solução de precipitação (TCA 10% e β -mercaptoetanol 0,07% em acetona) na proporção de 1/6. As proteínas foram deixadas precipitar por 15 h a -20°C e ao final deste período foram precipitadas por centrifugação a 10.000 x g por 35 minutos a 4°C, lavadas com 500 mL de metanol e 500 mL acetona gelada e por fim secas a vácuo. Ao final, as proteínas foram solubilizadas em tampão de reidratação (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 0,5%, tampão IPG (*Immobilized pH gradient*) 0,5% pH 3-10 e DTT 65 mM) e quantificadas usando reagente de Bradford (BRADFORD, 1976).

2.4 - Isoeletrofocalização

A isoeletrofocalização (IEF) das proteínas foi realizada em equipamento IPGphor (Amersham Biosciences®) em tiras IPG de 11 cm que continham um gradiente imobilizado de pH, em gel de poliacrilamida fixado em plástico, variando numa faixa linear de 4 a 7, fornecido pela empresa Amersham Biosciences®.

Antes do procedimento de IEF, as tiras IPG foram colocadas num suporte (com tamanho específico para cada tira) e submetidas ao processo de reidratação, onde após a mistura das amostras com a solução de reidratação (uréia 8M; CHAPS 2%; tampão IPG 3-10 2%; DTT 25mM e traços de azul de bromofenol) até o volume total de 200 μ L (GÖRG et al., 2007), estas foram então aplicadas nas tiras de IPG. Posteriormente, as tiras foram levadas para os suportes específicos do equipamento IPGphor, devidamente posicionadas, cobertas com óleo mineral (*Dry Strip Cover Fluid*) e então mantidas a 20°C por 12h. Após este período, a IEF foi iniciada e ocorreu em quatro etapas: 100V/1h, 500V/2h, 5000V/2:30h e 10000V/18000Vhr, totalizando 31600V/hT. Após a IEF, as tiras foram imediatamente equilibradas ou armazenadas em freezer -80°C para posterior utilização.

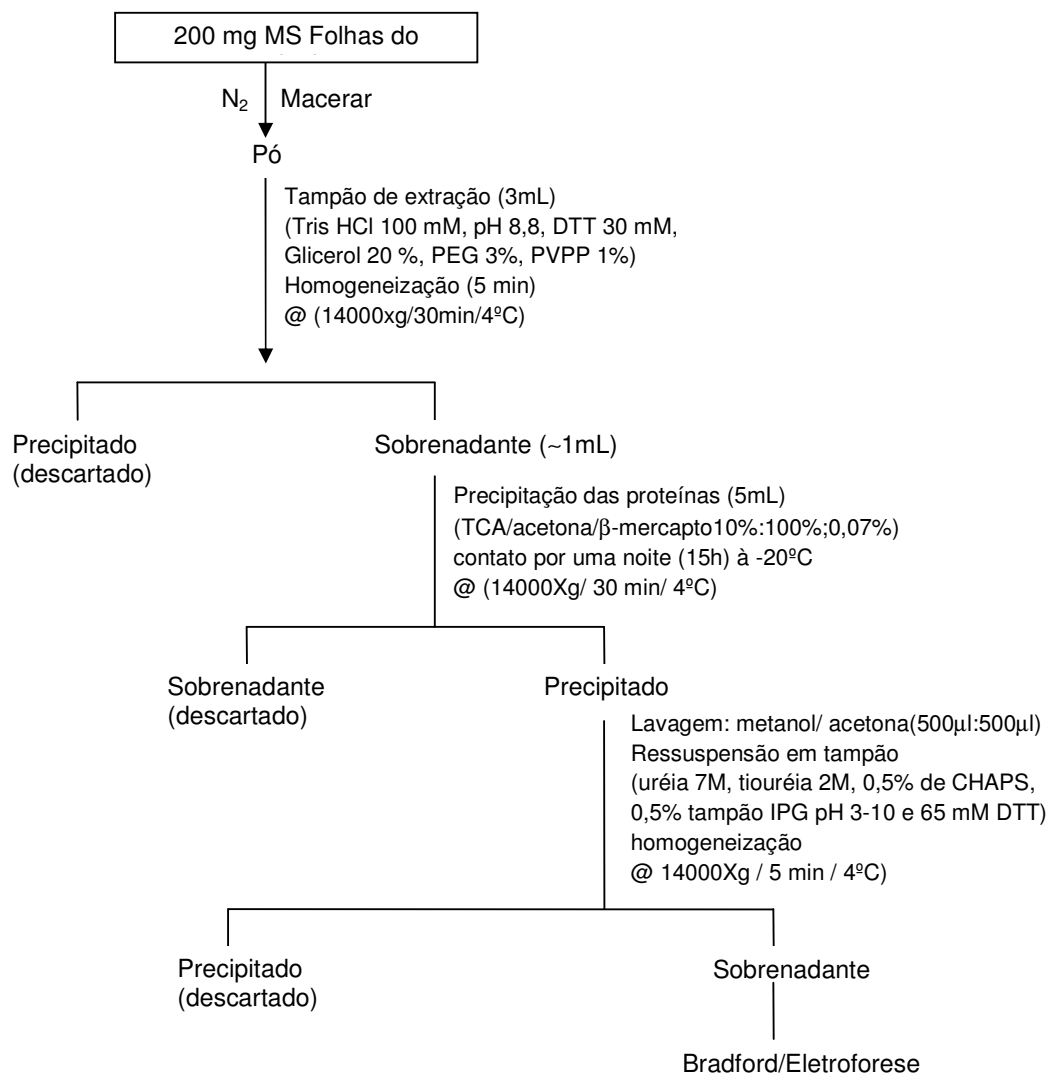


Figura 6 - Esquema da seqüência de extração de proteínas de folhas de plântulas de cajueiro para corrida eletroforética bidimensional sob condições desnaturantes.

2.5 – Equilíbrio das tiras de gradiente de pH imobilizado

Após a IEF, as tiras foram equilibradas em duas etapas de 15 minutos cada em 3 mL de tampão de equilíbrio (uréia 6M, glicerol 30% e SDS 2% em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,8) e 50mL de solução de azul de bromofenol 0,25%, sendo que na primeira etapa, 50mg de DTT foram adicionados ao tampão de equilíbrio e na segunda adicionou-se 200mg de iodoacetamida ao mesmo tampão. Após os dois passos de equilíbrio, as tiras foram lavadas com água destilada, submersas

por alguns minutos em tampão de corrida (LAEMMLI, 1970) e imediatamente submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

2.6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS-PAGE

A eletroforese das proteínas presentes nas tiras IPG foi feita em gel de poliacrilamida na presença de SDS-PAGE, utilizando a metodologia descrita por Laemmli (1970). Foi preparado gel de separação na concentração de 15% de poliacrilamida. A eletroforese foi realizada em géis de 18 x 16 cm em cuba tipo HoeferSE 600 Ruby (*Amersham Biosciences*[®]).

Após serem mergulhadas por alguns minutos no tampão de corrida, as tiras foram posicionadas horizontalmente no topo do gel, tomando-se o cuidado para que estas permanecessem em pleno contato, cobertas com 2mL de solução de agarose morna (Agarose 0,5%, SDS 1% e traços de azul de bromofenol) até que solidificassem. A corrida foi feita limitando-se a corrente a 20 mA/gel a uma temperatura de 18°C (mantida por refrigeração) e permaneceu até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel.

2.7 – Visualização dos géis bidimensionais (2D)

Os géis 2D foram visualizados por meio de coloração com *Coomassie Blue-Silver*, após serem primeiramente fixados em solução aquosa de etanol 30% e ácido fosfórico 2% (30 min; três vezes) e posterior lavagem com ácido fosfórico 2% (v/v) (20 min; três vezes). Ao final das lavagens, os géis foram mergulhados em 500 mL de solução contendo ácido fosfórico 2%, etanol 18% e sulfato de amônio 15% em água (30 minutos), e posteriormente 5mL de solução concentrada do corante foram acrescidos e os géis mantidos sob agitação constante por 24 a 72 horas.

2.8 – Captura e análise dos géis 2D

Após a obtenção dos géis 2D, estes foram digitalizados em escâner *ImageMaster* e as imagens analisadas através de software específico (*ImageMaster 2D Platinum*). Com a análise das imagens foi possível obter do peso molecular (PM) e do ponto isoelétrico (pI) dos peptídeos e/ou proteínas (*spots*) contidos nos géis. O algoritmo utilizado para identificação *in silico* dos *spots* dos géis 2D foi o *TagIdent* (WILKINS et al., 1996; 1998), uma ferramenta *on line* disponível no portal *ExPASy* (GASTEIGER et al., 2005).

Os géis 2D representativos de cada condição foram comparados a fim de se verificar diferenças de expressão e assim foram adotados os seguintes critérios: (1) a proteína foi considerada *induzida* ou *reprimida*, quando apareceu ou desapareceu do gel 2D, respectivamente, tomando como base o gel do tratamento controle (25°C) e (2) considerou-se como havendo diferença quantitativa de expressão, quando a proteína apresentou aumento ou diminuição de pelo menos duas vezes o volume normalizado. A intensidade dos *spots* foi definida como sendo a densidade óptica média e a quantificação dos *spots* (abundância) foi expressa pela percentagem do volume total dos *spots* sobre os géis 2D.

2.9 - Transferência das proteínas dos géis 2D para PVDF

Após separação por 2D algumas proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (difluoreto de polivinilideno) e submetidas ao seqüenciamento protéico pelo método de Edman em seqüenciador de proteínas Shimadzu (modelo PPSQ-23A). A seqüência de aminoácidos obtida foi comparada com as proteínas conhecidas nos programas de busca *Swiss-prot*, *PIR*, *Genpept* no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e *Protein Data Bank* (PDB) disponíveis na internet.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Concentração de proteínas

O conteúdo de proteína solúvel nas plântulas foram diferentemente afetados pelos efeitos isolados e combinados dos estresses hídrico e térmico (Figura 7). Nas plântulas submetidas ao estresse hídrico ou combinação dos estresses, o conteúdo de proteína solúvel foi reduzido em 22%, enquanto que nas plântulas expostas a 45 °C o conteúdo de proteína foi 27% maior.

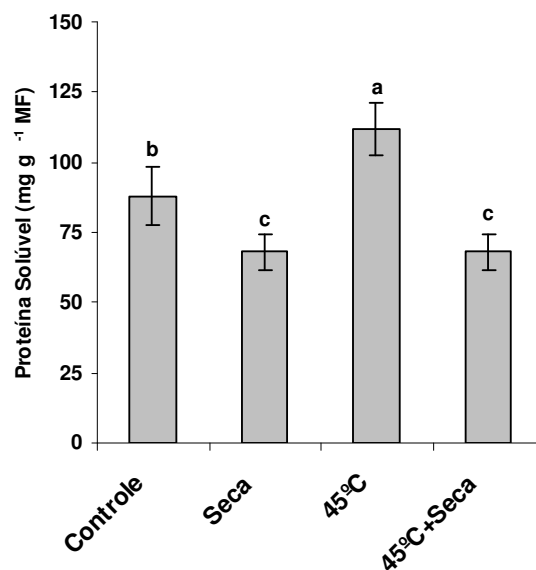


Figura 07 – Mudanças no conteúdo de proteínas solúveis em folhas de plântulas de cajueiro submetidas aos tratamentos (A) controle (Irrigadas + 25 °C por 12 h); (B) calor (Irrigadas + 45 °C por 12 h); (C) seca (20 dias de suspensão da rega + 25 °C por 12 h); e (D) seca + calor (20 dias de suspensão da rega + 45 °C por 12 h).

Uma importante estratégia de sobrevivência celular, realizada pelas espécies vegetais frente a situações adversas ou estressantes, é o acúmulo de proteínas (WANG et al. 2003), principalmente as solúveis, além de aminoácidos e outros compostos nitrogenados. Além do aumento quantitativo de proteínas observado na concentração de proteínas para as plântulas expostas ao tratamento de calor, também foi observado uma elevação nos géis de 2D neste

mesmo tratamento, comparado ao controle (Figura 8). A assimilação de carbono e nitrogênio em plantas são eventos fisiologicamente interligados, e a limitação da fotossíntese e do crescimento, ocasionada pelos estresses isolados ou combinados, tais como a seca e o calor, podem levar a alterações no nível e disponibilidade do nitrogênio e, conseqüentemente, nos seus derivados (XU e ZHOU, 2006).

3.2 – Expressão quantitativa das proteínas em gel bidimensional (2D)

A análise dos géis bidimensionais das proteínas de folhas de plântulas de cajueiro, expostas aos estresses isolados e combinados de seca e calor, revelou a predominância de modulação positiva e negativa dos estresses de temperatura e seca, respectivamente, na expressão das proteínas, como revelado pela presença e concentração dos *spots* (Figura 8). Na condição controle, plântulas irrigadas que não foram expostas ao estresse térmico, foram registrados 289 *spots*, enquanto nas plântulas expostas somente à seca foram observados 109 *spots*, indicando a repressão de 180 proteínas (*spots*) induzida pelo estresse hídrico (Figuras 8A e 8C).

Nas plântulas submetidas somente ao estresse de temperatura elevada foram registrados 300 *spots* e naquelas expostas à combinação dos estresses de seca e temperatura elevada foram verificados 152 *spots* (Figuras 8B e 8D). Com relação às plântulas controle, o estresse térmico isolado levou à indução de 11 proteínas no tecido foliar, enquanto a combinação dos estresses de seca e temperatura elevada resultou na repressão de 137 proteínas (*spots*). No geral, os resultados demonstram que os tratamentos de calor e seca estão associados com a indução e repressão de proteínas nas folhas do cajueiro, respectivamente.

Em nosso estudo, foi registrado um baixo número de *spots* em comparação com os mais de 1000 *spots* encontrados em géis 2D em diferentes situações de estresse (LEE et al., 2007; JIANG et al., 2007; WANG et al., 2008). Contudo, foi notável o efeito da temperatura como modulador positivo da expressão das proteínas observado no presente estudo. Outros trabalhos também relatam baixo número de *spots* em géis de 2D obtidos de plantas submetidas a determinadas situações de estresse (INGLE et al., 2007), inclusive para o cajueiro sob estresse salino, onde foram relatados 500 *spots* (ABREU et al., 2008).

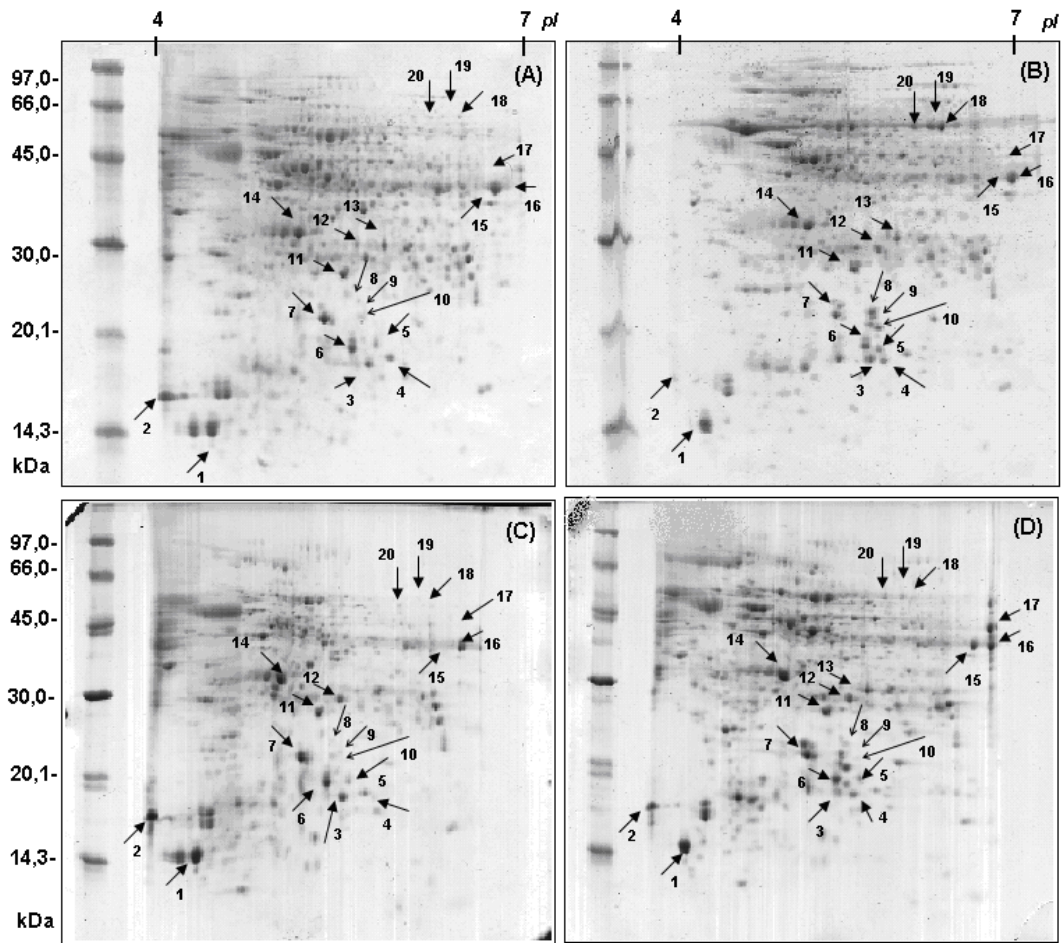


Figura 8 – Géis bidimensionais de proteínas de folhas de plântulas de cajueiro submetidas aos tratamentos (A) controle (Irigadas + 25 °C por 12 h); (B) calor (Irigadas + 45 °C por 12 h); (C) seca (20 dias de suspensão da rega + 25 °C por 12 h); e (D) seca + calor (20 dias de suspensão da rega + 45 °C por 12 h). Em cada gel foram aplicados 200 µg de proteína da fração ressuspensa.

Em relação ao controle, a análise dos géis permitiu a identificação de 50, 52 e 57 *spots* que apresentaram aumento de volume superior a 0,5% em resposta aos tratamentos de calor, seca e seca+calor, respectivamente (Tabelas 3, 4 e 5, localizadas nos anexos). Grande parte destes *spots* foram identificados nos bancos de dados proteômicos, com base no pI e na massa molecular, utilizando a ferramenta *TagIdent* do ExPASy. Para o presente estudo, entre os diversos *spots* identificados, foram selecionados 20 *spots* representativos, relacionados aos tratamentos de seca, calor e seca + calor, para uma análise mais detalhada da modulação de expressão, que se encontram indicados por setas (Figura 8).

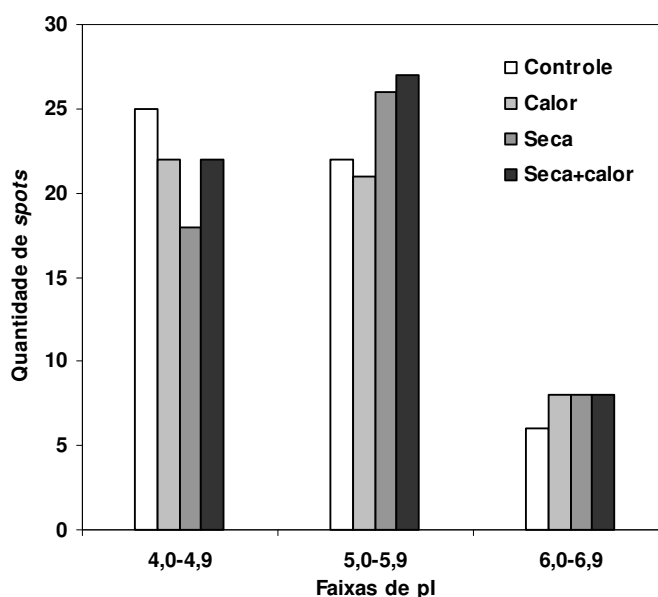


Figura 09 – Distribuição quantitativa em diferentes faixas de ponto isoelétrico (pI) dos *spots* encontrados nos géis bidimensionais de cajueiro anão precoce (Clone CCP 06) submetidas aos tratamentos: controle (Irrigadas + 25 °C por 12h); calor (Irrigadas + 45 °C por 12 h); seca (20 dias de suspensão da rega + 25 °C por 12 h); e seca + calor (20 dias de suspensão da rega + 45 °C por 12 h) em câmara BOD sob condições controladas. Os *spots* escolhidos foram aqueles que apresentaram volume maior que 0,5% em relação ao controle.

A análise dos 50 *spots* que apresentaram aumento de expressão (volume) nos géis de proteínas de folhas das plântulas expostas o tratamento de temperatura elevada, demonstrou que estes possuem massa molecular entre 14,4 e 70,1 kDa (estimados pelo *TagIdent* do ExPASy), que se distribuíram numa faixa

de ponto isoelétrico (pI) entre 4,25 a 6,78. Destes, cerca de 50% apresentaram valor de pI compreendido entre 5,1 a 5,9 (Figura 09).

Semelhantemente, a análise dos *spots* registrados com expressão diferencial nos tratamentos de seca (52 *spots*) e na combinação da seca e calor (57 *spots*), mostrou proteínas com o pI variando de 3,96 a 6,99 (para ambos tratamentos) e um agrupamento maior das proteínas na faixa de pI de 5,0 a 5,9. Apenas para estes dois últimos tratamentos foi possível registrar *spots* com pI abaixo de 4,0, tendo sido dois *spots* identificados para o tratamento de seca e um para a combinação da seca com o calor (Figura 09).

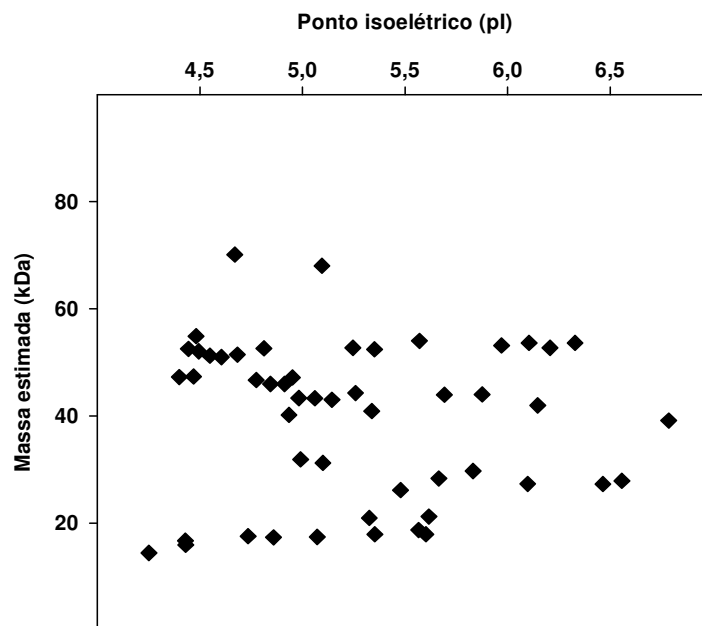


Figura 10 – Relação entre a massa estimada (kDa) e o ponto isoelétrico (pI) dos *spots* encontrados nos géis bidimensionais de cajueiro anão precoce (Clone CCP 06) submetidas aos tratamentos de calor (Irrigadas + 45 °C por 12 h) em câmara BOD sob condições controladas. Os *spots* escolhidos foram aqueles que apresentaram volume maior que 0,5% em relação ao controle.

Quando correlacionamos a massa aparente dos *spots* (massa estimada para o *spot*, simbolizada por Mr) com os seus pontos isoelétricos, pode-se notar que para o tratamento de calor mais *spots* foram agregados na faixa de 40 a 60 kDa e estes apresentaram pI numa faixa de variação de 4,5 a 5,0 (Figura 10).

Para os outros dois tratamentos, seca e seca combinada com calor, também é possível perceber um maior agregado dos *spots* na faixa de massa de 40-60 kDa, no entanto, a maioria destes *spots* apresenta pI variando entre 5,0 e 5,5 (figura 11A e B). Apesar dessa aparente ínfima diferença do pI (cerca de 0,5), fisiologicamente isto pode ser um ponto importante. Se a condição de seca estiver induzindo uma maior acidificação do meio citoplasmático, esta diferença na distribuição das proteínas pode representar uma estratégia para o enfrentamento do estresse.

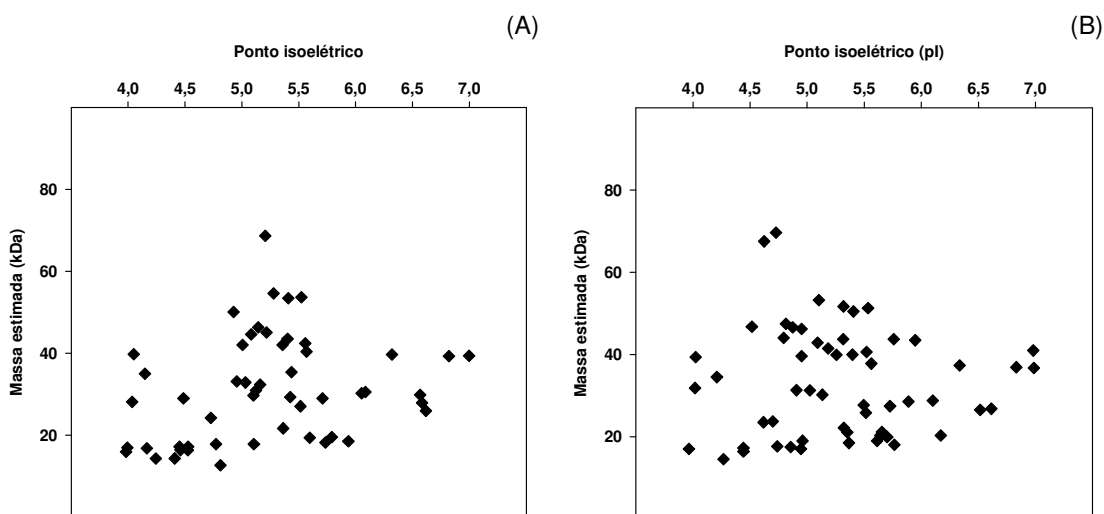


Figura 11 – Relação entre a massa estimada (kDa) e o ponto isoelétrico (pI) dos *spots* encontrados nos géis bidimensionais de folhas de plântulas de cajueiro expostas aos tratamentos de (A) seca (20 dias de suspensão da rega + 25 °C por 12 h); e (B) seca + calor (20 dias de suspensão da rega + 45 °C por 12 h). Os *spots* escolhidos foram aqueles que apresentaram volume maior que 0,5% em relação ao controle.

3.3 – Expressão qualitativa das proteínas em gel bidimensional (2D)

A análise global dos *spots* que apresentaram volume normalizado em relação ao controle de maior que 0,5% presentes nos diferentes tratamentos utilizados, permitiu classificá-los em 12 diferentes grupos (Figura 12). Houve um aumento nas proteínas relacionadas com o choque térmico quando as plantas foram submetidas ao calor, enquanto que a combinação dos fatores calor e seca

resultou num aumento expressivo das proteínas ligadas à fotossíntese. Na condição de seca, percebe-se um aumento das proteínas ligadas à dessecação ou desidratação, das deidrinas e, principalmente, das proteínas ligadas ao metabolismo do carbono (Figura 12).

Analisando o grupo de “proteínas do choque térmico”, que foram expressivas nas plantas submetidas ao calor, predominaram proteínas “heat shock” (HSPs), sugerindo que a indução destas proteínas funciona de forma crucial e precisa contra o estresse térmico devido as suas propriedades biológicas (LEWIS et al., 1999; LEE et al., 2007). As HSPs são proteínas freqüentemente identificadas em trabalhos com estresse térmico e desempenham importante papel no metabolismo das plantas, protegendo-as dos danos causados pelo estresse (LEE et al., 2007; QURESHI et al., 2007). As HSPs são chaperonas moleculares que reparam e/ou ajudam na renaturação de proteínas danificadas pelo estresse, além de proteger as células dos efeitos do estresse (XU e HUANG, 2008). Tais HSPs não são freqüentemente detectadas em condições vegetativas normais de crescimento, no entanto estas são induzidas por estímulos do ambiente e pelos estresses ambientais (SUN et al., 2002; WANG et al., 2004). Sugere-se que estas HSPs possam ser utilizadas como bio-marcadores do estresse térmico e sua alta diversidade dentro das células seja um reflexo de adaptações moleculares únicas das plantas em resposta aos estresses (LEWIS et al., 1999; WANG et al., 2004).

Pode-se notar que a combinação da seca com o calor levou a um aumento na incidência de proteínas relacionadas com a fotossíntese (Figura 12). A temperatura é uma variável ambiental que afeta fortemente os vegetais, sendo a elevação desta causadora de significativas perdas de produtividade em espécies agricultáveis (LEE et al., 2004; SUZUKI; MITTLER, 2006). O calor pode ser rapidamente sentido pelas perturbações físico-químicas de várias biomoléculas na membrana plasmática, citosol e organelas sub-celulares das células, as quais provocam sinais particulares para a resposta ao calor (LEE et al., 2007).

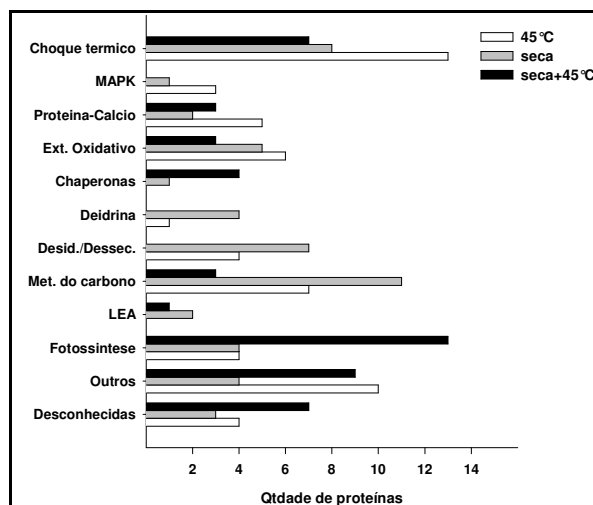


Figura 12 – Separação quantitativa dos *spots* encontrados nos géis bidimensionais de folhas de plântulas de cajueiro submetidas aos tratamentos de calor (Irrigadas + 45 °C por 12 h); seca (20 dias de suspensão da rega + 25 °C por 12 h); e seca + calor (20 dias de suspensão da rega + 45 °C por 12 h). Os grupos funcionais foram estabelecidos pelo agrupamento de cada *spot* isolado após a sua classificação pelo Talgdent (Expasy). Os *spots* escolhidos foram aqueles que apresentaram volume maior que 0,5% em relação ao controle.

A fotossíntese é um processo vital do metabolismo vegetal que é fortemente afetado pela seca, calor e pela combinação de ambos (MITTLER, 2006; QURESHI et al., 2007). Sob tais condições, as espécies vegetais passam a ajustar os componentes do aparato fotossintético responsáveis pela coleta (proteínas relacionadas com a clorofila) e utilização da luz (proteínas do transporte de elétrons) em busca de manter o balanço necessário entre estes dois componentes e conseqüentemente suas condições vitais (MULLER et al., 2005).

Sob a condição de estresse hídrico, observou-se uma elevação das proteínas relacionadas à dessecação e/ou desidratação e ainda nas deidrinas (Figura 12). Durante a seca ocorre uma redução da água livre dentro do citoplasma celular e, conseqüentemente, um desbalanço no potencial hídrico celular (BRAY et al., 2001; MUNNS, 2002). Desta forma, alguns compostos são sintetizados para que o potencial hídrico entre o vacúolo e citoplasma seja re-estabelecido (BRAY et al., 2001; NEPOMUCENO et al., 2001) e neste contexto as proteínas ligadas a dessecação e/ou desidratação desempenham importante

papel (SHARKEY, 2005). As deidrinhas, também chamadas de proteínas LEA D11, são frequentemente expressas após as plantas são expostas a estresses com um componente desidratativo, tais como a seca, a salinidade, entre outros (LOPEZ et al., 2003; MUNNS, 2002). Sugere-se que as deidrinhas podem ser consideradas proteínas indicadoras do estresse hídrico e desta forma usadas como biomarcadores moleculares no estudo deste estresse (CLOSE et al., 1993; LOPEZ et al., 2003).

Foram selecionados 20 *spots*, do grupo de *spots* registrado com aumento de volume superior a 0,5% nos quatro tratamentos empregados (controle, seca, calor e seca+calor), para uma análise mais detalhada (Figura 13A e B). No geral, a comparação dos tratamentos estressantes empregados em relação ao controle demonstrou inúmeras proteínas foram mais estimuladas que reduzidas (Figura 13A e B).

Das proteínas que foram reduzidas, as mais evidentes foram aquelas representadas pelos *spots* 1, 2, 6, 7 e 14 no tratamento calor (45°C), *spot* 13 na seca e *spot* 15 na combinação de seca e calor (Figura 13A e B); enquanto que os *spots* 1, 2, 6, 7 e 14 foram estimulados no tratamento de seca. Apresentaram indução os *spots* 16 e 17 no tratamento de seca combinado com calor e os *spots* 18, 19 e 20 no tratamento de calor (45°C), enquanto que a seca reprimiu os *spots* 8, 9 e 10 (Figura 13A e B).

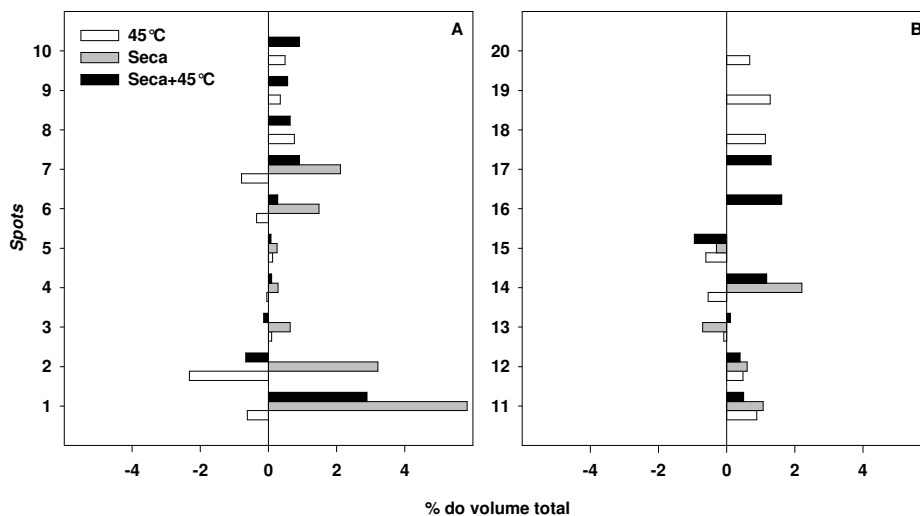


Figura 13 – Mudanças na modulação da expressão de proteínas de folhas de plântulas de cajueiro induzidas pelos tratamentos de calor (Irrigadas + 45 °C por 12 h); seca (20 dias de suspensão da rega + 25 °C por 12 h); e seca + calor (20 dias de suspensão da rega + 45 °C por 12 h). Os *spots* foram comparados com base no controle, representado pelo ponto zero (0), com barras positivas e negativas indicando indução e repressão, respectivamente. Os *spots* foram escolhidos a partir do grupo que apresentava volume maior que 0,5% em relação ao controle.

Os *spots* 1 e 2, estimulados pela seca e reduzidos pelo calor, foram registrados pelo *TagIdent* como sendo uma NAD(P)H-quinona oxidoredutase cadeia 3 cloroplástica e uma NAD(P)H-quinona oxidoredutase sub-6 cloroplástica, respectivamente, e a análise do N-terminal, através do método de Edman, permitiu identificá-las como uma plastocianina e uma ferredoxina, respectivamente (Tabela 2).

A plastocianina (*spot* 1; Figura 13A) é uma proteína móvel presente no lúmen do tilacóide que participa do processo fotossintético atuando como carreador de elétrons entre o citocromo *b₆f* e o fotossistema I (PSI) na cadeia transportadora de elétrons, enquanto a ferredoxina (*spot* 2; Figura 13A) é uma proteína hidrossolúvel presente nos cloroplastos que contém pelo menos um centro ferro-enxofre (-Fe-S-) e que media a transferência de elétrons do PSI para a NADP⁺ produzindo NADPH. Ambas as proteínas supracitadas participam do fluxo cíclico de elétrons, uma forma de dissipar o excesso de elétrons absorvidos pelos fotossistemas I e II (PSI e PSII) presentes nos vegetais e então inibir a

fotoinibição do PSII (ORT; BAKER, 2002; MIYAKE; OKAMURA, 2003). Em plantas de *Arabidopsis* com o PSI silenciado, relatou-se um aumento da síntese de plastocianinas e os autores relacionaram este fato como sendo estratégia de dissipação da energia recebida, provavelmente através do fluxo cíclico de elétrons, semelhante ao que ocorre em condições de luminosidade e temperatura elevada (HALDRUP et al., 2000; ORT e BAKER, 2002). A indução da ferredoxina em plantas sob estresse hídrico pode ser considerada uma estratégia de dissipação de energia, tal como foi relatado para plantas de tabaco (MUNNÉ-BOSCH et al., 2005).

Tabela 2 – Identificação de proteínas induzidas pelos estresses de seca e de seca + calor em folhas de plântulas de cajueiro. A identificação foi por meio da seqüência N-terminal e comparação das seqüências obtidas com àquelas existentes em banco de dados do NCBI.

N° do Spot ^a	pl/kDa putativo ^b	pl/kDa mensurado ^c	Seqüência ^d	Proteína homóloga putativa (%) ^e
1	3,4/1846	4,3/14456	N-IEILLGGDDGSQAFVPSQ	Plastocianina [<i>Cucumis sativus</i>] (46,9%)
2	6,8/1795	3,9/17079	N-AVHKVKLITPEGVQEF	Ferredoxina I [<i>Trifolium pratense</i>] (38,8%)

^aNúmero dos spots mostrados na Figura 14; ^bValores de ponto isoelétrico (pl) e peso molecular (kDa) estimados através da ferramenta "Compute pI/MW" do ExPASy; ^cValores aproximados de peso molecular (kDa) e ponto isoelétrico (pl) estimados no gel de plantas submetidas a seca. ^dSeqüências N-terminal de aminoácidos determinadas por degradação de Edman; ^eIdentificação putativa das proteínas identificadas no banco de dados do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI).

De modo geral, as situações de estresse levam a um desbalanço entre as fases bioquímicas e fotoquímicas da fotossíntese (WAHID et al., 2007; HIKOSAKA et al., 2006). Por exemplo, o estresse hídrico provoca uma redução da condutância estomática e conseqüente limitação de CO₂, enquanto que a elevação da temperatura resulta numa alteração do fluxo de elétrons entre o PSII e PSI (HERNANDEZ et al., 2000; MITTLER, 2002). Outro evento que ocorre em situações de estresse é a elevação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), também reflexo do desbalanço da fotossíntese (MITTLER, 2002; WAHID et al., 2007). Esta elevação na produção de ROS pode ser uma sinalização para um ajustamento do metabolismo do vegetal a nova condição e, portanto, um ajuste do aparato fotossintético, porém pode ser prejudicial devido aos danos oxidativos causados pelas ROS (APEL et al., 2004; QURESHI et al., 2007).

No tratamento que combinou a seca com a temperatura elevada foi notável que os spots 16 e 17 foram estimulados de forma exclusiva (Figura 13B). A análise pelo *TagIdent* identificou os dois spots como sendo peroxidases. As

peroxidases são um grupo de enzimas que participam do seqüestro das ROS e desta forma são importantes na defesa dos estresses (SREENIVASULU et al., 1999). A restrição hídrica leva a uma condição de fechamento estomático e diminuição da eficiência fotossintética, condições que desestabilizam o metabolismo bioquímico do vegetal, levando a um aumento na produção de ROS (WAHID et al., 2007; CATTIVELLI et al., 2008). Assim, a indução de enzimas que possam atuar na retirada destas ROS, tais como as peroxidases, é uma estratégia importante no enfrentamento do estresse, seja ele hídrico, salino ou térmico (MUNNS, 2002; PARIDA ; DAS, 2005).

A análise do tratamento de calor permitiu a identificação de três *spots* exclusivos: *spots* 18, 19 e 20 (Figura 13B), que foram registrados como sendo uma chaperonina mitocondrial, uma sintase da pinosilvina e uma sintase do estilbeno, respectivamente. As chaperoninas são proteínas constitutivas abundantes nos vegetais e freqüentemente relacionadas com o mecanismo de defesa, visto que aumentam sua quantidade após as plantas serem submetidas a diversas situações estressantes, tais como choque térmico, seca, salinidade, ataque de patógenos, entre outros (NOLLEN; MORIMOTO, 2002; WANG et al., 2004).

Isso se dá devido à função das chaperoninas as quais reorganizam a estrutura nativa de proteínas dobradas de maneira imprópria, estabilizam fatores de transcrição celular e ainda restauram as proteínas parcialmente desnaturadas pelo calor (SPREMULLI, 2000; GOMES et al., 2007). Desta forma, a ação das chaperoninas permite uma adaptação do vegetal em situações de aumento de temperatura por preservar as enzimas essenciais (GOMES et al., 2007).

As enzimas sintase da pinosilvina e uma sintase do estilbeno (*spots* 19 e 20, respectivamente) são enzimas que participam da síntese de estilbenos (CROTEAU et al., 2000; KODAN et al., 2001). Os estilbenos são um grupo de compostos que atuam no metabolismo secundário dos vegetais e são freqüentemente relacionados com a defesa ao ataque de patógenos além de outros tipos de estresses (STARK-LORENZEN et al., 1997; CROTEAU et al., 2000). Os estilbenos também são considerados compostos antioxidantes e desta forma podem ajudar a combater as espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas em maior quantidade devido ao estresse oxidativo conseqüente dos

estresses bióticos e abióticos (CROTEAU et al., 2000; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

As respostas dos vegetais podem ser extremamente semelhantes tanto sob estresses abióticos como para os bióticos, devido principalmente a desestabilização que ocorre na homeostase celular (MITTLER, 2002; 2006), a qual pode levar ao retardo do crescimento e desenvolvimento e, algumas vezes, a morte do vegetal (KOTAK et al., 2007). O acúmulo de ROS é um evento que caracteriza o estresse oxidativo e pode ser desencadeado quando as plantas se encontram sob diversas condições de estresses abióticos e/ou bióticos (NEILL et al., 2002; MITTLER, 2006). Estas ROS são extremamente prejudiciais para estruturas e macromoléculas celulares, devido a sua alta reatividade, e compostos antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos são necessários para neutralizar seus efeitos tóxicos no metabolismo celular (PASTORI; FOYER, 2002; FOYER; NOCTOR, 2005).

4 - CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a análise proteômica efetuada privilegiou proteínas mais leves (em torno de 45000 Da) e mais ácidas (pI 5 a 5,5); não foi possível obter a identificação de todas as espécies protéicas *in silico*, e dentre as proteínas identificadas as de choque térmico apresentaram uma maior representatividade. Observou-se, sob condições de calor, 3 proteínas, foram exclusivamente induzidas, bem como duas foram exclusivamente induzidas pela seca, porém nenhuma proteína foi exclusivamente induzida pela seca, no entanto, nesta condição, a modulação da expressão de proteínas foi marcadamente a mais afetada.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C.E.B.; PRISCO, J.T.; NOGUEIRA, A.R.C.; BEZERRA, M.A.; LACERDA, C.F.; GOMES-FILHO, E. Physiological and biochemical changes occurring in dwarf-cashew seedlings subjected to salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 2, p. 105-118, 2008.

APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

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

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists. Pp.1158-1203, 2000.

CATTIVELLI, L.; RIZZA, F.; BADECK, F.W.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A.M.; FRANCIÀ, E.; MARÉ, C.; TONDELLI, A.; STANCA, A.M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, v. 105, p. 1-14, 2008.

CHANG, W.W.; HUANG, L.; SHEN, M.; WEBSTER, C.; BURLINGAME, A.L.; ROBERTS, J.K. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment and identification of proteins by mass spectrometry. **Plant Physiology**, v. 122, p. 295-318, 2000.

CLOSE, T.J.; FENTON, R.D.; MOONAN, F. A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. **Plant Molecular Biology**, v. 23, p. 279-286, 1993.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (Secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists. Pp.1250-1318, 2000.

FOYER, C.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, cell and Environment**, v. 28, p. 1056-1071, 2005.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. **Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server**. John M. Walker (ed). The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. p. 571-607, 2005.

GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GÖRG, A.; BOGUTH, G.; DREWS, O.; HARDER, A.; OBERMAIER, C.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. **Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis**. A Laboratory Manual. Disponível em: <<http://www.weihenstephan.de/blm/deg>> Acesso em 10 dez. 2007.

HALDRUP, A.; SIMPSON, D.J.; SCHELLER, H.V. Down-regulation of the PSI-F Subunit of Photosystem I (PSI) in *Arabidopsis thaliana*: The PSI-F subunit is essential for photoautotrophic growth and contributes to antenna function. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 40, p. 31211-31218, 2000.

- HERNANDEZ, J.A.; JIMENEZ, A.; MULLINEAUX, P.; SEVILLA, F. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. **Plant Cell Environmental**, v. 23, p. 853-862, 2000.
- HIKOSAKA, K.; ISHIKAWA, K.; BORJIGIDAI, A.; MULLER, O.; ONODA, Y. Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 2, p. 291-302, 2006.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, Berkeley, 32p, 1950 (**Circular 347**).
- HURKMAN, W.J.; TANAKA C.K. The effect of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. **Plant Physiol.**, v. 83, p. 517-524, 1987.
- HURKMAN, W.J.; TANAKA, C.K.; DUPONT, F.M. The effects of salt stress on polypeptides in membrane fractions from barley roots. **Plant Physiol.**, v. 88, p. 1263-1273, 1988.
- INGLE, R.A.; SCHMIDT, U.G.; FARRANT, J.M.; THOMSON, J.A.; MUNDREE, S.G. Proteomic analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. **Plant, Cell and Environment**, v.30, p. 435-446, 2007.
- INGRAM J.; BARTELS D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 377-403, 1996.
- JIANG, Y.; YANG, B.; HARRIS, N.S.; DEYHOLOS, M.K. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, p. 3591-3607, 2007.
- KERSTEN, B., BURKLE, L., KUHN, E.J., GIAVALISCO, P., KONTHUR, Z., LUEKING, A., WALTER, G., EICKHOFF, H.; SCHNEIDER, U. Large-scale plant proteomics. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 133-141, 2002.
- KODAN, A.; KORUDA, H.; SAKAI, F. Simultaneous expression of stilbene synthase genes in Japanese red pine (*Pinus densiflora*) seedlings. **Journal of Wood Science**, v. 47, p. 58-62, 2001.
- KOTAK, S.; LARKINDALE, J.; LEE, U., von KOSKULL-DÖRING, P.; VIERLING, E.; SCHARF, K.D. Complexity of heat stress response in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 310-316, 2007.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEE, S.; LEE, E.J.; YANG, E.J.; LEE, J.E.; PARK, A.R.; SONG, W.H.; PARK, O.K. Proteomic Identification of Annexins, Calcium-Dependent Membrane Binding Proteins That Mediate Osmotic Stress and Abscisic Acid Signal Transduction in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 16, p. 1378-1391, 2004.
- LEE, D.G.; AHSAN, N.; LEE, S.H.; KANG, K.Y.; BAHK, J.D.; LEE, I.J.; LEE, B.H. A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. **Proteomics**, v. 7, p. 3369-3383, 2007.
- LEWIS, S.; HANDY, R.D.; CORDI, B.; BILLINGHURST, Z.; DEPLEDGE, M.H. Stress proteins (HSPs): methods of detection and their use as an environmental biomarker. **Ecotoxicology**, v. 8, p. 351-368, 1999.
- LOPEZ, C.G.; BANOWETZ, G.M.; PETERSON, C.J.; KRONSTAD, W.E. Dehydrin Expression and Drought Tolerance in Seven Wheat Cultivars. **Crop Science**, v. 43, p. 577-582, 2003.

- MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. Review: Natural Antioxidants from the Lamiaceae Family. Application in Food Products. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.
- MITTLER, R.; MERQUIOL, E.; HALLAK-HERR, E.; RACHMILEVITCH, S.; KAPLAN, A.; COHEN, M. Living under a 'dormant' canopy: a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama raetam*. **The Plant Journal**, v. 25, p. 407-416, 2001.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 405-410, 2002.
- MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Plant Science**, v. 11, p. 1360-1385, 2006.
- MIYAKE, C.; OKAMURA, M. Cyclic Electron Flow within PSII Protects PSII from its Photoinhibition in Thylakoid Membranes from Spinach Chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 44, n. 4, p. 457-462, 2003.
- MOFFAT, A.S. Finding new ways to protect drought-stricken plants. **Science**, v. 296, p. 1226-1229, 2002.
- MULLER, O.; HIKOSAKA, K.; HIROSE, T. Seasonal changes in light and temperature affect the balance between light harvesting and light utilisation components of photosynthesis in an evergreen understory shrub. **Oecologia**, v. 143, p. 501-508, 2005.
- MUNNÉ-BOSCH, S.; SHIKANAI, T.; ASADA, K. Enhanced ferredoxin-dependent cyclic electron flow around photosystem I and α -tocopherol quinone accumulation in water-stressed *ndhB*-inactivated tobacco mutants. **Planta**, v. 222, p. 502-511, 2005.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant Cell and Environment**, v. 25, p. 239-250, 2002.
- NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R.B.; OYA, T. Tolerância a seca em plantas - Mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 23, p. 12-18, 2001.
- NEILL, S.J.; RADHIKA, D.; CLARKE, A.; HURST, R.D.; HANCOCK, J.T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1237-1247, 2002.
- NOLLEN, E.A.A.; MORIMOTO, R.I. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 2809-2816, 2002.
- ONG, S.E., MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature Chemical Biology**, v.1, p.253-262, 2005.
- ORT, D.R.; BAKER, N.R. A photoprotective role for O_2 as an alternative electron sink in photosynthesis? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p.193-198, 2002.
- PANDEY, A.; MANN, M.; Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.
- PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324-349, 2005.
- PARK, O.K. Proteomic Studies in Plants. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 133-138, 2004.

PASTORI, G.M.; FOYER, C.H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. **Plant Physiology**, v. 129, p. 460-468, 2002.

QUEITSCH, C.; HONG, S.W.; VIERLING, E.; LINDQUIST, S. Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 12, p. 479-492, 2000.

QURESHI, M.I.; QADIR, S.; ZOLLA, L. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1239-1260, 2007.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; MITTLER, R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1143-1151, 2002.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; DAVLETOVA, S.; MITLER, R. When defense pathways collide: the response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1683-1696, 2004.

SHARKEY, T.D. Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, p. 269-277, 2005.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought and cold stress. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 161-167, 1996.

SPREMULLI, L. Protein synthesis, Assembly and Degradation. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists. Pp. 412-454, 2000.

SREENIVASULU, N.; RAMANJULU, S.; RAMACHANDRAKINI, K.; PRAKASH, H. S.; SHEKAR-SHETTY, H.; SAVITHRI, H.S.; SUDHAKAR, C. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. **Plant Science**, v. 141, p. 1-9, 1999.

STARK-LORENZEN, P.; NELKE, B.; HÄNBLE, G.; MÜHLBACH, H.P.; THOMZIK, J.E. Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell Reports**, v. 16, p. 668-673, 1997.

SUN, W.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1577, p. 1-9, 2002.

SUZUKI, N.; MITTLER, R. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. **Physiol. Plant**, v. 126, p.45-51, 2006.

VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 579-620, 1991.

WAHID, A.; CLOSE, T.J. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. **Biologia Plantarum**, v. 51, p. 104-109, 2007.

WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M. e FOOLAD, M.R. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, p. 199–223, 2007.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 244–52, 2004.

WANGXIA, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p. 1-14, 2003.

WANG, X.; YANG, P.; GAO, Q.; LIU, X.; SHEN, T.K.S.; HE, Y. Proteomic analysis of the response to high-salinity stress in *Physcomitrella patens*. **Planta**, v. 228, p. 167-177, 2008.

WILKINS, M.; GASTEIGER, E.; SANCHEZ, J.C.; APPEL, R.; HOCHSTRASSER, D. Protein identification with sequence tags. **Current Biology**, v. 6, p. 1543-4, 1996.

WILKINS, M.; GASTEIGER, E.; TONELLA, L.; KELI, O.; TYLER, M.; SANCHEZ, J.C.; GOOLEY, A.; WALSH, B.; BAIROCH, A.; APPEL, R.; WILLIAMS, K.; HOCHSTRASSER, D. Protein identification with N and C-terminal sequence tags in proteome projects. **Journal Molecular Biology**, v. 278, n. 3, p. 599-608. 1998.

XU, C.; HUANG, B. Root proteomic responses to heat stress in two *Agrostis* grass species contrasting in heat tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 15, p. 4183-4194, 2008.

XU, Z.Z.; ZHOU, G.S. Combined effects of water stress and high temperature on photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. **Planta**, v. 224, p. 1080-1090, 2006.

ZIVY, M.; VIENNE, D. Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. **Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 575-580, 2000.

ANEXOS

Tabela 3 - Proteínas diferencialmente expressas em folhas de plantas de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) submetidas a estresse por temperatura elevada, identificadas através do TagIdent

Estresse por temperatura				
spot	pI	MM	Identificação	n ° Acesso
18	5,1	68032	Heat shock cognate 70 kDa protein	HSP7C_PETHY (P09189)
	4,5	54882	Calreticulin	CALR_MAIZE (Q9SP22)
	6,2	52709	Chaperonin CPN60, mitochondrial	CH60_BRANA (P35480)
	5,2	52709	Heat stress transcription factor A-4b	HFA4B_ORYSJ (Q94J16)
	4,8	52616	Heat stress transcription factor A-1e	HFA1E_ARATH (Q9SCW5)
	4,5	52064	Full=Calreticulin;ne-related peptide type 1 receptor;; pr	CALR_BERST (Q9ZPP1)
	5,0	47186	Mitogen-activated protein kinase 10	MPK10_ARATH (Q9M1Z5)
	4,8	46691	Heat shock factor protein HSF30	HSF30_SOLPE (P41152)
	4,9	45959	Heat stress transcription factor A-2c	HFA2C_ORYSJ (Q338B0)
	4,8	45959	Heat stress transcription factor A-8	HSFA8_ARATH (Q9S7U5)
	5,9	44009	Putative heat stress transcription factor A-6a	HFA6A_ORYSJ (Q5Z6A4)
	5,7	43958	Choline monooxygenase, chloroplastic	CHMO_BETVU (O22553)
	5,3	44268	Heat stress transcription factor A-4b	HFA4B_ORYSJ (Q94J16)
	5,1	43293	Isoform 2 of Heat stress transcription factor A-9 OS=Oryz...	HSFA9_ORYSJ (Q10PR4-2)
	5,1	43040	Isoform 2 of Heat stress transcription factor B-2c OS=Ory	HFB2C_ORYSJ (Q652B0-2)
	6,1	41945	Mitogen-activated protein kinase homolog MMK2	MMK2_MEDSA (Q40353)
	5,3	40925	Heat stress transcription factor A-4a	HFA4A_ARATH (O49403)
	4,9	40165	Heat stress transcription factor A-6b	HFA6B_ARATH (Q9LUH8)
14	5,1	31219	Dehydrin ERD10	ERD10_ARATH (P42759)
	5,0	31885	Dehydration-responsive element-binding protein 2B	DRE2B_ARATH (O82133)
	6,6	27882	Embryonic abundant protein USP92	EA92_VICFA (P21747)
7	6,1	27313	Osmotin-like protein OSML13	OS13_SOLCO (P50701)
	5,3	20945	17.8 kDa class II heat shock protein	HSP22_MAIZE (P24632)
4	5,4	17911	17.6 kDa class I heat shock protein	HSP12_ARATH (P13853)
5	4,7	17543	Putative desiccation-related protein LEA14	LEA14_ARATH (O03983)
	pI	MM	Identificação	n ° Acesso
	4,5	47352	Calreticulin	CALR_MAIZE (Q9SP22)
	4,4	47269	Calreticulin-1	CALR1_ARATH (O04151)

Continuação da tabela 3				
	5,0	43344	Heat stress transcription factor A-2a	HFA2A_ORYSJ (Q84MN7)
15	6,8	39143	Isoform 2 of Mitogen-activated protein kinase 11 OS=Arabi	MPK11_ARATH (Q9LMM5-2)
13	5,8	29693	Stress-related protein.	SRP_VITRI (Q9SW70)
Estresse oxidativo				
<i>spot</i>	<i>pl</i>	<i>MM</i>	Identificação	nº Acesso
11	5,5	26151	Glutathione S-transferase ERD13	GSTF3_ARATH (P42761)
8	5,6	21211	Glutathione S-transferase APIC	GSTF2_TOBAC (P46440)
10	5,1	17398	Peroxiredoxin-2E-2, chloroplastic	PR2E2_ORYSJ (Q7F8S5)
Metabolismo do carbono				
Fotossíntese				
<i>spot</i>	<i>pl</i>	<i>MM</i>	Identificação	nº Acesso
	6,3	53643	Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein	PSBC_NUPAD (A1XFV1)
	5,4	52432	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, c	RCA2_TOBAC (Q40565)
	5,6	54021	Full=RubisCO large subunit-binding protein subunit alpha	RUBA_CHLRE (Q42694)
	6,5	27282	Chloroplast envelope membrane protein	CEMA_LOBMA (A4QLK6)
3	5,6	17896	Thylakoid lumenal 19 kDa protein, chloroplastic	TL19_ARATH (P82658)
	4,9	17326	Thylakoid lumenal 15.0 kDa protein 2, chloroplastic	TL15B_ARATH (Q9LVV5)
6	5,6	18700	Photosystem I assembly protein ycf3	YCF3_CUSRE (A7M967)
12	5,7	28332	Chloroplast envelope membrane protein.	CEMA_PLAOC (Q09G34)
1	4,3	14400	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 3, chloroplastic.	NU3C_CAPBU (A4QKJ7)
Transdução de sinal				
<i>spot</i>	<i>pl</i>	<i>MM</i>	Identificação	nº Acesso
	4,4	16691	Calmodulin-like protein 2	CML2_ARATH (Q9SU00)
Outros metabolismos				
<i>spot</i>	<i>pl</i>	<i>MM</i>	Identificação	nº Acesso
	4,7	70126	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subuni...	ACCD_CHLSC (A6MMD1)
19	6,1	53643	Pinosylvin synthase 2	DPS2_PINST (P48408)
20	6,0	53174	Stilbene synthase 6	THS7_VITVI (A2ICC6)
	4,4	52524	Cyclin-dependent kinase F-1	CDKF1_ARATH (O80345)
	4,7	51428	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subuni...	ACCD_GOSBA (A0ZZ44)
	4,5	51248	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subuni	ACCD_CICAR (B5LMN4)
	4,4	15934	Uncharacterized protein At1g16640	Y1664_ARATH (Q9FX77)
	4,6	50978	RAN GTPase-activating protein 1	RAGP1_ARATH (Q9LE82)

Tabela 4 - Proteínas diferencialmente expressas em estresse por seca em folhas de cajueiro identificadas por TagIdent

Estresse Hídrico				
spot	pl	PM	Identificação	n ° Acesso
	5,21	68682	Heat shock 70 kDa protein	HSP70_MAIZE (P11143)
	5,28	54591	Heat stress transcription factor A-5.	HSFA5_ORYSJ (Q6K6S5)
	4,93	50118	Heat stress transcription factor A-6b	HFA6B_ARATH (Q9LUH8)
	5,14	46327	Dehydration-responsive element-binding protein 2A	DRE2A_ARATH (O82132)
	5,08	44599	Isoform 2 of Heat stress transcription factor A-9 OS=Oryz	HSFA9_ORYSJ(Q10PR4-2)
	5,00	42080	Dehydration-responsive element-binding protein 2B	DRE2B_ARATH (O82133)
14	5,16	32321	Dehydration-responsive element-binding protein 2A	DRE2A_ARATH (O82132)
	4,95	33151	Isoform 2 of Heat stress transcription factor A-2c OS=Ory...	HFA2C_ORYSJ (Q338B0-2)
	5,12	30908	Dehydrin ERD10	ERD10_ARATH (P42759)
	6,09	30587	Heat stress transcription factor C-2a	HFC2A_ORYSJ (Q6EUG4)
	6,05	30224	Heat stress transcription factor C-2a	HFC2A_ORYSJ (Q6EUG4)
	6,57	29889	Embryonic abundant protein VF30.1	EA30_VICFA (P21745)
	5,10	29668	Dehydrin ERD10	ERD10_ARATH (P42759)
	5,43	29340	Dehydration-responsive element-binding protein 1E	DRE1E_ORYSI (A2XWL6)
	6,58	27925	Embryonic abundant protein USP92	EA92_VICFA (P21747)
	6,62	25929	Dehydrin Rab25	DHR25_ORYSJ (P30287)
7	5,36	21701	Dehydration-responsive element-binding protein 1J	DRE1J_ORYSI (A2YXQ7)
4	5,94	18564	17.9 kDa class II heat shock protein	HSP21_SOYBN (P05477)
	4,53	17179	Desiccation-related protein At2g46140	LEA2R_ARATH (O82355)
	4,45	17195	Wound-responsive protein GWIN3	GWIN3_POPSP (P16335)
	4,52	16334	Desiccation-related protein At2g46140	LEA2R_ARATH (O82355)
5	5,79	19524	17.4 kDa class I heat shock protein 3	HSP23_ORYSJ (Q84Q77)
	4,73	24224	14-3-3-like protein GF14 psi.	14333_ARATH (P42644)
15	6,82	39292	Mitogen-activated protein kinase 4	MPK4_ORYSJ (Q5Z859)
Estresse oxidativo				
spot	pl	PM	Identificação	N° Acesso
	6,32	39704	Peroxidase 59	PER59_ARATH (Q39034)
11	5,51	27075	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	APX1_PEA (P48534)
	5,11	17858	Superoxide dismutase [Cu-Zn].	SODC_CAPAN (O22373)

Continuação da tabela 4

Metabolismo do carbono				
Carboidrato/Fotossíntese				
spot	pl	PM	Identificação	N° Acesso
	5,40	43548	Enolase	ENO_ORYSJ (Q42971)
	4,49	28979	Lectin	LEC_ACAFA (P84849)
	4,77	17841	Ribulose biphosphate carboxylase small chain 4, chloropl...	RBS4_ACEAT (P16137)
	4,81	12646	Ribulose biphosphate carboxylase small chain 1, chloropl	RBS1_SOLLC (P08706)
	7,00	39409	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	G3PE_MAIZE (Q43247)
	5,41	53482	Beta-amylase	AMYB_SOYBN (P10538)
	5,22	45077	Hexokinase-7	HXK7_ORYSJ (Q1WM16)
	5,56	42395	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic	PGKH_TOBAC (Q42961)
	5,36	42080	Photosystem Q(B) protein	PSBA_STAPU (Q32RX1)
	5,57	40420	Photosystem II D2 protein	PSBD_ANGEV (A2T330)
6	5,60	19392	Thylakoid lumenal 19 kDa protein, chloroplastic	TL19_ARATH (P82658)
	4,46	16382	NifU-like protein 1, chloroplastic	NIFU1_ARATH (Q93W77)
	4,24	14303	NAD(P)H-quinone oxidoreductase chain 3, chloroplastic	NU3C_LOTJA (Q9BBT8)
2	3,99	16964	NAD(P)H-quinone oxidoreductase sub 6, chloroplastic	NU6C_IPOPU (A7Y3L7)
1	4,41	14358	NAD(P)H-quinone oxidoreductase chain 3, chloroplastic	NU3C_SACHY (Q6L394)
3	5,74	18243	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplastic	UCRIA_ORYSJ (Q69S39)
12	5,71	29015	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit K, chloroplastic	NDHK_PHAVU (A4GG93)
Outros metabolismos				
spot	pl	PM	Identificação	n ° Acesso
	5,44	35398	Protease Do-like 1, chloroplastic	DEGP1_ARATH (O22609)
	5,03	32856	Phosphoprotein ECPP44.	ECP44_DAUCA (Q9XJ56)
	5,52	53666	Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	AL7A1_BRANA (Q41247)
	3,98	15928	Putative calcium-binding protein CML23	CML23_ORYSJ (Q8RYJ9)
Transdução de sinal				
spot	pl	PM	Identificação	n ° Acesso
	4,16	16800	Calmodulin.	CALM_FAGSY (Q39752)
Não identificadas				
spot	pl	PM	Identificação	n ° Acesso
	4,05	39763	-	-
	4,15	35031	-	-
	4,04	28167	-	-

Tabela 5 - Proteínas diferencialmente expressas em folhas de cajueiro anão precoce sob estresse combinado de seca e temperatura elevada em folhas de cajueiro identificadas por TagIdent.

Estresse combinado de seca e calor				
spot	pl	PM	Proteína	Número de acesso
	5,102	53182	Heat stress transcription factor A-1a	HFA1A_ARATH (P41151)
	5,318	51686	Heat stress transcription factor A-4a	HFA4A_ARATH (O49403)
	4,813	47448	Heat stress transcription factor A-1e	HFA1E_ARATH (Q9SCW5)
	4,874	46586	Heat stress transcription factor A-1d	HFA1D_ARATH (Q9LQM7)
	4,951	46208	Mitogen-activated protein kinase 10	MPK10_ARATH (Q9M1Z5)
	4,515	46776	Calreticulin	CALR_CHLRE (Q9STD3)
	5,316	43697	Calreticulin-2	CALR2_ARATH (Q38858)
	5,184	41446	Heat stress transcription factor B-2b	HFB2B_ORYSJ (Q6Z9C8)
	6,336	37341	Mitogen-activated protein kinase homolog NTF3	NTF3_TOBAC (Q40517)
15	6,832	36905	Mitogen-activated protein kinase 4	MPK4_ORYSJ (Q5Z859)
	5,024	31260	Dehydration-responsive element-binding protein 1A	DRE1A_ORYSJ (Q64MA1)
	4,905	31306	Putative heat stress transcription factor A-6a.	HFA6A_ORYSJ (Q5Z6A4)
14	5,133	30221	Heat stress transcription factor A-7b	HFA7B_ARATH (Q9M1V5)
	5,888	28519	Full=Small heat shock protein, chloroplastic;;protein hrt...	HS23C_CHERU (P11890)
13	6,612	26808	Dehydrin Rab25	DHR25_ORYSJ (P30287)
	4,618	23528	Dehydration-responsive element-binding protein 1I	DRE1I_ORYSJ (Q0J3Y6)
	5,322	22167	17.8 kDa class II heat shock protein	HSP22_MAIZE (P24632)
	5,351	21096	Dehydration-responsive element-binding protein 1J	DRE1J_ORYSJ (Q0J3Y7)
7	6,170	20305	22.7 kDa class IV heat shock protein	HSP41_PEA (P19244)
	5,366	18475	17.6 kDa class I heat shock protein	HSP12_ARATH (P13853)
5	5,764	18013	22.0 kDa class IV heat shock protein	HSP41_SOYBN (P30236)
	4,737	17679	Putative desiccation-related protein LEA14	LEA14_ARATH (O03983)
	4,945	16997	Heat shock 22 kDa protein, mitochondrial	HS23M_ARATH (Q96331)
Estresse oxidativo				
spot	pl	PM	Proteína	Número de acesso
	6,101	28809	Osmotin-like protein OSML13	OS13_SOLCO (P50701)
	5,496	27666	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	APX1_PEA (P48534)
11	5,515	25802	L-ascorbate peroxidase, cytosolic	APX1_PEA (P48534)
	5,701	19931	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	GPX4_CITSI (Q06652)
10	6,979	40962	Peroxidase 37	PER37_ARATH (Q9LDN9)
17	6,985	36742	Peroxidase 37	PER37_ARATH (Q9LDN9)
Metabolismo do carbono				
spot	pl	PM	Proteína	Número de acesso
	5,406	50438	Beta-amylase	AMYB_SOYBN(P10538)
	4,794	44019	Fructose-1,6-bisphosphatase, chloroplastic	F16P1_BRANA(Q0720)
	5,091	42870	Histidinol-phosphate aminotransferase, chloroplastic	HIS8_ARATH (Q949X3)
	5,521	40602	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme 1, chloroplastic	FNRL1_ARATH (Q9FKW6)
	5,726	27418	Chloroplast envelope membrane protein	CEMA_CARPA (B1A947)
12	5,640	20282	Photosystem I assembly protein ycf3	YCF3_STIHE (Q06SJ8)
9				

Continuação da Tabela 5

	pl	PM	Proteína	Número de acesso
3	4,960	19001	Ribulose biphosphate carboxylase small chain 3, chloropl	RBS3_ACECL (P16131)
6	5,613	19001	Photosystem I assembly protein ycf3	YCF3_CHLSC (A6MMC3)
	4,857	17498	Thylakoid lumenal 15.0 kDa protein 2, chloroplatic	TL15B_ARATH (Q9LVV5)
Transdução de sinal				
spot	pl	PM	Proteína	Número de acesso
	4,624	67512	RAN GTPase-activating protein 1	RAGP1_ARATH (Q9LE82)
Outros metabolismos				
spot	pl	PM	Proteína	Número de acesso
	4,727	69648	Carbonic anhydrase mRNA cap guanine-N7	CAH_DUNSA (P54212)
	4,951	39601	methyltransferase 2	MCES2_ARATH (Q5HZ60)
	5,563	37782	Photosystem II D2 protein	PSBD_PSINU (Q8W119)
	6,516	26508	Myb-related protein Myb4	MYB4_ORYSJ (Q7XBH4)
	4,698	23741	Ran-binding protein 1 homolog c	RBP1C_ARATH (P92985)
	4,442	17254	Probable calcium-binding protein CML16	CML16_ARATH (Q9LI84)
	4,442	16403	Probable calcium-binding protein CML25/26	CML25_ORYSJ (Q2QYW1)
1	4,266	14536	Putative calcium-binding protein CML19	CML19_ORYSJ (Q8RYJ8)
	5,534	51267	Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1	AL7A1_BRANA (Q41247)
	5,758	43697	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1	GLNA1_VITVI (P51118)
	5,946	43441	Stilbene synthase 6	THS7_VITVI (A2ICC6)
	5,397	39952	Glutamine synthetase PR-2	GLNA2_PHAVU (P04771)
	5,257	39893	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1- 1	GLN11_ARATH (Q56WN1)
8	5,655	21191	Glutaredoxin-C9.	GRXC9_ORYSJ (Q7XIZ1)
Não identificada				
spot	pl	PM	Proteína	Número de acesso
	4,023	39369	-	-
	4,210	34493	-	-
	4,019	31862	-	-
2	3,964	17029	-	-