



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA

NATHÁLIA DIAS DE OLIVEIRA AMARAL

ANÁLISE FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA DAS RESPOSTAS AO
ESTRESSE SALINO EM PLANTAS ENXERTADAS DE CAJUEIRO ANÃO
PRECOCE (*ANACARDIUM OCCIDENTALE* L.)

FORTALEZA

2016

NATHÁLIA DIAS DE OLIVEIRA AMARAL

ANÁLISE FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA DAS RESPOSTAS AO
ESTRESSE SALINO EM PLANTAS ENXERTADAS DE CAJUEIRO ANÃO PRECOCE
(ANACARDIUM OCCIDENTALE L.)

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia/Fitotecnia.

Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho

Coorientador: Dr. Marlos Alves Bezerra

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A515a Amaral, Nathalia Dias de Oliveira.
Análise fisiológica, bioquímica e proteômica das respostas ao estresse salino em plantas enxertadas de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) / Nathalia Dias de Oliveira Amaral. – 2016.
142 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho.
Coorientação: Prof. Dr. Marlos Alves Bezerra .
1. *Anacardium occidentale* L.. 2. Enxertia. 3. Estresse Salino. 4. Proteômica. 5. Tolerância à Salinidade. I.
Título.

CDD 630

NATHÁLIA DIAS DE OLIVEIRA AMARAL

ANÁLISE FISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E PROTEÔMICA DAS RESPOSTAS AO
ESTRESSE SALINO EM PLANTAS ENXERTADAS DE CAJUEIRO ANÃO PRECOCE
(*ANACARDIUM OCCIDENTALE* L.)

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 25 de janeiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Enéas Gomes Filho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Marlos Alves Bezerra
Embrapa Agroindústria Tropical

Profa. Dra. Maria Raquel Alcântara Miranda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Alexandre Bosco de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Rosilene Oliveira Mesquita
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus meu, em quem confio.

Aos meus pais, Oliveira e Lúcia e sogros,
Amaral e Fátima.

Aos meus irmãos, Olívia, Thiago, Samuel e
Sarah, e cunhados(as), Igor, Gilvânia, Cristina
e Patrícia.

Aos meus sobrinhos, Gabriel, Ana Luiza e
Laís.

Ao meu amado esposo, Fábio Amaral e meu
grande amor, meu lindo filho, Victor.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, sem o qual nada seria possível. Obrigada meu Senhor, por iluminar meu caminho e guiar meus passos.

Ao meu pai, *José Waldemar Oliveira Filho* e, especial a minha querida mãe, *Lúcia Maria Magalhães Dias*, a quem dedico este trabalho, um agradecimento especial pela educação, incentivo, sabedoria e compreensão durante toda a minha vida. AMO VOCÊS.

Ao meu esposo e melhor amigo *Fábio Teixeira do Amaral*, a quem dedico este trabalho, um agradecimento todo especial pelo carinho, apoio e compreensão dedicados a mim durante todos esses anos de convívio e que foram de extrema valia ao longo desta caminhada.

Ao meu filho amado *Victor Oliveira Amaral*, que mesmo sem entender, soube respeitar e compreender tantas ausências ao longo desta jornada. Pelo seu amor e carinho, que são únicos para uma mãe.

A todos os meus familiares, que sempre torceram para que eu alcançasse meus objetivos.

À Universidade Federal do Ceará por disponibilizar o curso pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia.

À EMBRAPA Agroindústria Tropical por ceder todo o material, instalações e equipamentos necessários à realização deste trabalho.

Ao professor Dr. *Enéas Gomes Filho* a quem tenho grande admiração, um agradecimento especial pela orientação, apoio e incentivo durante esta etapa de minha formação acadêmica, bem como pela paciência a mim despendida nos últimos cinco anos.

Ao Dr. *Marlos Alves Bezerra*, pelos conselhos e orientação no desenvolvimento e condução deste trabalho.

Aos amigos, *Reivany Lima* e *Laise Ferreira*, do laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Agroindústria Tropical, pelos ajuda e contribuição no estágio inicial deste trabalho.

Ao amigo *Rafael de Souza Miranda*, pelo companheirismo e grande ajuda em todas as etapas deste trabalho.

À amiga e professora *Rosilene Oliveira Mesquita*, pela amizade e inestimável contribuição durante todas as etapas deste trabalho, bem como pelos grandes ensinamentos passados durante todo esse período de convivência.

Ao amigo *Elton Camelo Marques*, pelo companheirismo, apoio e grande contribuição para a realização deste trabalho.

Aos professores *Alexandre Bosco de Oliveira* e *Maria Raquel Alcântara Miranda*, por aceitar participar de minha banca examinadora, pela compreensão e pelas críticas e sugestões a este trabalho.

Aos amigos *Daniel Farias de Oliveira*, *Valdineia Soares Freitas*, *Stelamaris de Oliveira Paula*, *Gyedre dos Santos Araújo*, *Ian Nunes Valença*, *Luckas Huriel Duarte de Menezes*, pelo companheirismo e pela ajuda nos experimento.

Aos demais amigos e colegas que compõem ou compuseram o Laboratório de Fisiologia Vegetal, *Ana Raquel*, *Alexcyane Feijão*, *Carlos Eduardo*, *Cibelle Gadelha*, *Elaine Angelim*, *Evaldo Heber*, *Franklin Aragão*, *Irinaldo Nascimento*, *Prof. Joaquim Enéas*, *Jones Vidal*, *Lyndefânia Sousa*, *Lílian Silva*, *Liliane Silva*, *Lineker Lopes*, *Nara Lídia*, *Natanael Freitas*, *Paulo André*, *Thalita Montoril*, *Thiago Augusto*, *Victor Castro*, *Viviane Ruppenthal* e *Wallace Edelky*, pela convivência, amizade, pelos momentos de descontração e por me ajudarem direta ou indiretamente no andamento deste trabalho.

Aos amigos e colegas do curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, especialmente meus grandes amigos, *Afrânio*, *Aline*, *Glauber*, *Hayna*, *Ravena* e *Tiago*, pelo companheirismo e pelos momentos de estudos e diversão.

Ao Laboratório de Análises Proteômicas, da Universidade de Fortaleza, coordenado pela professora Dra. *Ana Cristina de Oliveira Monteiro-Moreira*. Em especial ao *Frederico Bruno Mendes Batista Moreno* pelo apoio na realização das análises de espectrometria de massas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em, especialmente àqueles de quem tive a oportunidade de ser aluno, pelas experiências e ensinamentos compartilhados comigo, bem como aos demais membros do Departamento de Agronomia/Fitotecnia (estudantes e funcionários), em especial ao *Deocleciano*, secretário do curso de pós-graduação, pelas informações e ajuda prestada durante todo o meu curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de doutorado durante os anos de 2010 a 2014.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTSal), que através do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), concedeu auxílio financeiro para a execução desta e de outras pesquisas do Laboratório de Fisiologia Vegetal.

E por fim a todas as pessoas que de qualquer forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e que não foram supracitadas, o meu sincero agradecimento.

O SENHOR é o meu pastor, nada me faltará. Em verdes prados me faz descansar, e para águas tranquilas me guia em paz. Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do Seu nome. Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me protegem. Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos. Tu me honras, unguendo a minha cabeça com óleo e fazendo transbordar o meu cálice. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na casa do Senhor por dias sem fim.

Salmo 23: 1-6 (Bíblia, 2012. p. 512)

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo estudar respostas fisiológicas e bioquímicas e elaborar um perfil proteico de folhas de plantas de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) submetidas a estresse salino. Foram utilizadas quatro combinações enxerto/porta-enxerto (CCP 06/CCP 06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), cujas mudas enxertadas foram cultivadas por um período de 60 dias em vasos plásticos furados na base, contendo 7 L de solo. Os tratamentos consistiram de um controle (água destilada) e soluções salinas com condutividade elétrica (CEa) de 2,0 e 4,0 dS m⁻¹. Os efeitos do estresse salino foram avaliados por meio de variáveis fisiológicas (medidas de crescimento, trocas gasosas, teor relativo de água, teor relativo de clorofila e fluorescência da clorofila *a*) e bioquímicas (enzimas antioxidantes em folhas e raízes, acúmulo de íons e solutos orgânicos em folhas, caules e raízes e padrão de expressão proteica foliar), bem como da identificação e caracterização das proteínas relacionadas às respostas a esse estresse abiótico. De modo geral, para as medidas de crescimento (diâmetro do enxerto e do porta-enxerto, comprimento do caule e da raiz, número de folhas, área foliar, teor relativo de água e massa fresca e seca das folhas, dos caules e das raízes), as plantas que sofreram menores e maiores reduções em seu desenvolvimento foram as combinações BRS 265/CCP 06 e CCP06/CCP06, respectivamente. O estresse salino reduziu significativamente o teor relativo de clorofila em todas as combinações, sendo esse efeito mais evidente nas combinações CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265, a 4,0 dS m⁻¹. Já entre as enxertias, os maiores valores foram detectados na combinação BRS 265/CCP 06. Esses resultados correlacionaram-se com as maiores reduções, causadas pela salinidade, na fotossíntese líquida, na transpiração, na condutância estomática e na eficiência de carboxilação da rubisco, da combinação CCP 06/CCP 06, e com as menores reduções, observadas na combinação BRS 265/CCP 06. A eficiência quântica do fotossistema II foi reduzida pela salinidade a 4,0 dS m⁻¹, em todas as combinações de enxertia, quando comparadas aos tratamentos controle; em termos absolutos, os maiores valores dessa variável foram registrados nas plantas BRS 265/CCP 06, tendo havido correlação com o melhor desempenho fotossintético e crescimento das plantas desse tratamento sob salinidade. A atividade da dismutase do superóxido (SOD) nas folhas pouco variou, em decorrência dos tratamentos. Já nas raízes, a salinidade reduziu drasticamente a atividade da SOD, especialmente a 4,0 dS m⁻¹, mas esse efeito foi menos evidente nas plantas das enxertias BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265. A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) nas folhas foi reduzida pela salinidade em todas as combinações de enxertia, e BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 foram as plantas que apresentaram maior atividade dessa enzima. Nas raízes,

houve uma resposta similar quanto à salinidade, à exceção da combinação BRS 265/BRS 265, em que a atividade da APX aumentou sob estresse. A atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) só foi detectada nas raízes, em que ela aumentou em todas as plantas, com a salinidade, exceto em BRS 265/BRS 265, em que houve redução. Os teores de Cl⁻ aumentaram com o incremento dos sais na água de irrigação, independente do órgão analisado e da combinação de enxertia. Em relação aos tratamentos de enxertia foram detectadas alterações significativas desse íon apenas nas folhas das plantas expostas a 4,0 dS m⁻¹, sendo os maiores valores registrados na combinação CCP 06/CCP 06. Os teores de K⁺ apresentaram variações significativas em função de todos os tratamentos analisados, exceto nas folhas da combinação BRS 265/BRS 265. Plantas BRS 265/CCP 06 foram as únicas que tiveram os teores de K⁺ reduzidos significativamente, tanto a 2,0, quanto a 4,0 dS m⁻¹. As combinações CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265 apresentaram incrementos de 35 e 84%, respectivamente, a 4,0 dS m⁻¹, em comparação aos controles. Caules e raízes de todas as combinações de enxertia apresentaram reduções nos teores deste íon, independentemente do estresse salino. Sob estresse salino, os teores de Na⁺ aumentaram em todos os órgãos analisados, independentemente do tipo de enxertia. A combinação de enxertia teve efeito significativo nas folhas a 4,0 dS m⁻¹, em que houve aumentos de 248, 269 e 456% nas enxertias BRS 265/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e CCP 06/BRS 265, respectivamente. Já as plantas CCP 06/CCP 06 apresentaram incrementos de 650%, em relação ao controle. Na relação Na⁺/K⁺, plantas CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265 tiveram aumentos similares a 2,0 e 4,0 dS m⁻¹, nas folhas, enquanto que as BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 aumentaram com o incremento da CEa. Nos caules, esta relação aumentou drasticamente com a salinidade, onde plantas BRS 265/CCP 06 a 4,0 dS m⁻¹ apresentaram valores 350% maiores que os do controle. Já nas raízes, os menores valores, a 4,0 dS m⁻¹, foram observados nas plantas BRS 265/CCP 06, sugerindo uma compartimentação preferencial de Na⁺ nos caules em relação aos demais órgãos. De modo geral, os teores de carboidratos ou se mantiveram inalterados, ou foram reduzidos pela salinidade, nos três órgãos da planta. Os teores de prolina e de N-aminossolúveis nas folhas e nos caules, por sua vez, aumentaram fortemente com a salinidade, especialmente a 4,0 dS m⁻¹ e nas combinações BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265. Nas raízes, as variações nesses teores dependeram da combinação de enxertia; os teores de prolina aumentaram apenas nas combinações CCP 06/BRS 265 e BRS 265/CCP 06, ao passo que os de N-aminossolúveis, apenas nas plantas CCP 06/CCP 06 e BRS 265/CCP 06. A salinidade causou aumentos e diminuições nas taxas de expressão de várias proteínas, sendo que algumas desapareceram completamente e outras foram aparentemente sintetizadas *de*

novo nas plantas estressadas. No total, foram observados 347 *spots* com modulação diferencial (índice de variação igual ou superior a 1,4 vezes), e o maior número de aumentos e síntese *de novo* ocorreu nas plantas BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265. Na espectrometria de massas, em que 151 *spots* foram analisados, foi possível a identificação de 128 proteínas (85%), enquanto que 23 polipeptídeos (15%) não foram encontradas nos bancos de dados consultados. Das proteínas identificadas, 27,3% estão envolvidas com o metabolismo fotossintético; 25,0%, com o metabolismo energético/reserva; 13,3%, com as respostas a estresses; 10,2%, com o metabolismo dos carboidratos; 7,0%, com o metabolismo secundário; 7,0%, com o metabolismo dos aminoácidos; 5,5%, com o metabolismo energético; 3,1%, com o metabolismo antioxidativo e 1,6%, relacionado à parte estrutural. Este trabalho mostra o valor do uso combinado de estudos fisiológicos e bioquímicos associados à análise proteômica, onde uma melhor relação de evidências é obtida, e uma avaliação mais clara dos mecanismos de aclimação/tolerância pode ser realizada. Entre as combinações de enxertia estudadas, a que se mostrou mais tolerante aos sais foi a BRS 265/CCP 06, enquanto a menos tolerante foi a CCP 06/CCP 06.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale* L.; cajueiro anão precoce; enxertia; estresse salino; proteômica; tolerância à salinidade.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the physiological and biochemical responses and elaborate a protein profile of leaves of dwarf cashew plants (*Anacardium occidentale* L.) subjected to salt stress. Four scion/rootstock combinations (CCP 06/CCP 06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 and BRS 265/BRS 265) were grown in plastic pots with 7.0 L of soil. The plants were irrigated by using water with electric conductivity (EC_w) of 0.8 (control), 2.0 and 4.0 dS m⁻¹. After 60 days of treatment, we analyzed the variables of growth (leaf area, dry mass, and scion and rootstock diameter), physiologic (gas exchange, water relative content, SPAD index and chlorophyll fluorescence) and biochemical (antioxidant enzymes, organic and inorganic solutes, and leaf protein profile), as well as identified and characterized the salt-stress responsive proteins. In general, the data clearly showed that BRS 265/CCP 06 plants were less affected by salinity, whereas CCP 06/CCP 06 plants were the most injured by salt stress. Salinity significantly decreased the chlorophyll relative content in all scion/rootstocks combinations, with the more conspicuous effects at 4.0 dS m⁻¹ in CCP 06/CCP 06 and CCP 06/BRS 265 plants. In addition, the highest chlorophyll content values were detected in the BRS 265/CCP 06 plants. The higher and lower salt tolerance of BRS 265/CCP 06 and CCP 06/CCP 06, respectively, was correlated with alterations in the photosynthesis, transpiration, stomatal conductance and Rubisco carboxylation efficiency. The photosystem II quantum efficiency was reduced by 4.0 dS m⁻¹ salinity, irrespective of scion/rootstock treatment, as compared to control. Under salinity, a better performance of photosystem II was found in BRS 265/CCP 06 plants which was concordant with the better photosynthetic and growth rates. The leaf superoxide dismutase (SOD) activity was little altered by studied treatments. On the other hand, in roots, salt stress severely decreased the SOD activity, especially at 4.0 dS m⁻¹, it being less evident in the BRS 265/CCP 06 and BRS 265/BRS 265 combinations. The activity of ascorbate peroxidase (APX) in the leaves was significantly reduced by salinity in different scion/rootstocks treatments; however, under irrigation with saline water, the biggest APX activity was registered in the plants BRS 265/CCP 06 and BRS 265/BRS 265. In roots, a similar response was observed, except for salt-stressed BRS 265/BRS 265 plants, which showed APX activity higher than the control. Interestingly, guaiacol peroxidase (GPX) activity was detected only in roots and it was improved by salinity, except for BRS 265/BRS 265 plants. The Cl⁻ content improved by increasing the salts in the water irrigation, regardless the plant organ and scion/rootstock combination. At 4.0 dS m⁻¹, CCP 06/CCP 06 plants exhibited a massive accumulation of Cl⁻ in the leaves, showing the highest values of this ion as compared by other treatments. The K⁺ concentrations significantly vary as affected by all

analyzed treatments, except for leaves of BRS 265/BRS 265 combination. Reductions in leaf K^+ content by salinity in the irrigation water were detected only in BRS 265/CCP 06 plants. In contrast, at salinity of 4.0 dS m^{-1} , CCP 06/CCP 06 and CCP 06/BRS 265 plants showed K^+ content 35 and 84% higher than the control plants, respectively. In roots and stems, all scion/rootstock combinations had their K^+ content decreased by salt stress, regardless of CE in the irrigation water. In presence of salinity, Na^+ content increased in all plant organs, irrespective of scion/rootstock treatment. Nonetheless, the highest improvements were registered in the leaves, where BRS 265/BRS 265, BRS 265/CCP 06 and CCP 06/BRS 265 plants exhibited Na^+ content values 248, 269 and 456% bigger than the respective controls. Surprisingly, the Na^+ content in salt-stressed CCP 06/CCP 06 plants was 650% higher than the control. Although the leaf Na^+/K^+ ratio had showed similar enhancement at 2.0 and 4.0 dS m^{-1} in both CCP 06/CCP 06 and CCP 06/BRS 265 treatments, it was increased with the increment of salinity in the irrigation water in BRS 265/CCP 06 and BRS 265/BRS 265 combinations. In stems, the Na^+/K^+ ratio drastically increased in high-salt stressed plants (4.0 dS m^{-1}), with values found in BRS 265/CCP 06 combination 350% greater than the control; whereas in roots, these plants showed the lowest values of this ratio, suggesting a Na^+ preferential accumulation mechanism in the stem. Carbohydrate content was little or not altered by salinity. Conversely, proline and free amino acids contents strongly increased in leaves and stems, mainly at 4.0 dS m^{-1} in BRS 265/CCP 06 and BRS 265/BRS 265 plants; and their content differentially change in roots as affected by scion/rootstock treatment. Whereas the proline content improved in CCP 06/BRS 265 and BRS 265/CCP 06 plants, the free amino acids increased exclusively in CCP 06/CCP 06 and BRS 265/CCP 06 ones. Salt stress differentially altered the expression of several proteins, as well as promoted *de novo* synthesis and deletion of some proteins. Herein, proteomic characterisation by two-dimensional gel electrophoresis (2DE) showed 347 differentially expressed spots (p value < 0.05 and intensity % > 1.4 -fold) by both salinity and scion/rootstock treatments. A total of 151 spots were analyzed by LC-ESI-MS/MS, but only 128 proteins (85%) were identified and 23 (15%) were not found in protein data banks. The identification of these spots indicated that the major groups of differential proteins were associated with photosynthetic metabolism (27.3%), reserve/energy metabolism (25%), response to stresses (13.3%), carbohydrate metabolism (10.2%), secondary metabolism (7.0%), amino acids metabolism (7.0%), energy metabolism (5.5%), antioxidant metabolism (3.1%) and structural (1.6%). Our research evidences the impact of physiological and biochemical studies combined with proteomic approach, revealing an efficient strategy to elucidate the mechanisms of salt stress

acclimation/tolerance. In conclusion, our data suggest that the combination of BRS 265 (as scion) and CCP 06 (as rootstock) is more advantageous for the growth of dwarf cashew plants under salt stress.

Keywords: *Anacardium occidentale* L.; dwarf cashew plants; grafting; salt stress; proteomic; salt tolerance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Visão geral do experimento conduzido em casa de vegetação com dois clones de cajueiro anão precoce porta-enxertados, com quatro combinações de enxertia.....	39
Figura 2 -	Diâmetro do caule do enxerto e do porta-enxerto e comprimento do caule e da raiz de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce.....	52
Figura 3 -	Número de folhas e área foliar de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce.....	53
Figura 4 -	Aparência fenotípica de plantas de cajueiro anão precoce com diferentes combinações de enxertia, após 60 dias de cultivo na ausência e presença de estresse salino a 2,0 e 4,0 dS m ⁻¹	54
Figura 5 -	Massa fresca e massa seca das folhas, caules e raízes de plantas de cajueiro anão precoce de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto.....	56
Figura 6 -	Teor relativo de água de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce.....	57
Figura 7 -	Índice SPAD de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce.....	58
Figura 8 -	Fotossíntese líquida, condutância estomática, transpiração e eficiência de carboxilação de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce.....	59
Figura 9 -	Eficiência quântica do fotossistema II de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce.....	60
Figura 10 -	Atividade das enzimas dismutase do superóxido, peroxidase do ascorbato e peroxidase do guaiacol nas folhas e raízes de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce.....	62
Figura 11 -	Teores de cloreto em folhas, caules e raízes de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce.....	65
Figura 12 -	Teores de potássio e sódio em folhas, caules e raízes de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce.....	66
Figura 13 -	Relação Na ⁺ /K ⁺ em folhas, caules e raízes de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce.....	68
Figura 14 -	Teores de carboidratos solúveis em folhas, caules e raízes de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce.....	70
Figura 15 -	Teores de prolina em folhas, caules e raízes de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce.....	72
Figura 16 -	Teores de N-aminossolúveis em folhas, caules e raízes de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro	73

	anão precoce.....	
Figura 17 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce, combinações CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265 na ausência de estresse salino.....	76
Figura 18 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce, combinações CCP 06/CCP 06 e BRS 265/CCP 06 na ausência de estresse salino.....	77
Figura 19 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce, combinações CCP 06/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 na ausência de estresse salino.....	78
Figura 20 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce, combinações CCP 06/BRS 265 e BRS 265/CCP 06 na ausência de estresse salino.....	79
Figura 21 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce, combinações CCP 06/BRS 265 e BRS 265/BRS 265 na ausência de estresse salino.....	80
Figura 22 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce, combinações BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 na ausência de estresse salino.....	81
Figura 23 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce entre as combinações CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265 sob condições de estresse salino a 4,0 dS m ⁻¹	82
Figura 24 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce entre as combinações CCP 06/CCP 06 e BRS 265/CCP 06 sob condições de estresse salino a 4,0 dS m ⁻¹	83
Figura 25 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce entre as combinações CCP 06/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 sob condições de estresse salino a 4,0 dS m ⁻¹	84
Figura 26 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce entre as combinações CCP 06/BRS 265 e BRS 265/CCP 06 sob condições de estresse salino a 4,0 dS m ⁻¹	85
Figura 27 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce entre as combinações CCP 06/BRS 265 e BRS 265/BRS 265 sob condições de estresse salino a 4,0 dS m ⁻¹	86
Figura 28 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce entre as combinações BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 sob condições de estresse salino a 4,0 dS m ⁻¹	87
Figura 29 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce combinação CCP 06/CCP 06 sob condições controle e estresse salino a 2,0 dS m ⁻¹	88
Figura 30 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce combinação CCP 06/CCP 06 sob condições controle e estresse salino a 4,0 dS m ⁻¹	88
Figura 31 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce combinação CCP 06/CCP 06 sob condições de estresse salino a 2,0 dS m ⁻¹ e 4,0 dS m ⁻¹	89

Figura 32 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce combinação CCP 06/BRS 265 sob condições controle e estresse salino a 2,0 dS m ⁻¹	90
Figura 33 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce combinação CCP 06/BRS 265 sob condições controle e estresse salino a 4,0 dS m ⁻¹	91
Figura 34 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce combinação CCP 06/BRS 265 sob condições de estresse salino a 2,0 dS m ⁻¹ e 4,0 dS m ⁻¹	91
Figura 35 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce combinação BRS 265/CCP 06 sob condições controle e estresse salino a 2,0 dS m ⁻¹	92
Figura 36 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce combinação BRS 265/CCP 06 sob condições controle e estresse salino a 4,0 dS m ⁻¹	93
Figura 37 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce combinação BRS 265/CCP 06 sob condições de estresse salino a 2,0 dS m ⁻¹ e 4,0 dS m ⁻¹	94
Figura 38 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce combinação BRS 265/BRS 265 sob condições controle e estresse salino a 2,0 dS m ⁻¹	95
Figura 39 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce combinação BRS 265/BRS 265 sob condições controle e estresse salino a 4,0 dS m ⁻¹	96
Figura 40 -	Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de cajueiro anão precoce combinação BRS 265/CCP 06 sob condições de estresse salino a 2,0 dS m ⁻¹ e 4,0 dS m ⁻¹	97
Figura 41 -	Classes funcionais das proteínas diferencialmente expressas em folhas de cajueiros anão precoce com quatro combinações de enxerto/porta-enxerto submetidos ao estresse salino.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proteínas identificadas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265) de dois clones de cajueiro anão precoce, irrigadas com água destilada e com água com condutividade elétrica de 2,0 e 4,0 dS m ⁻¹ . Os <i>spots</i> obtidos por eletroforese 2D foram identificados por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF).....	123
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A</i>	Taxa de fotossíntese líquida
ACN	Acetonitrila
AF	Área foliar
<i>A/Ci</i>	Eficiência de carboxilação da Rubisco
APX	Peroxidase do ascorbato
CEa	Condutividade Elétrica
CHAPS	3[(3-cholamidopropil)dimetilamônio]-1-propanesulfonato hidrato
<i>Ci</i>	Concentração interna de CO ₂
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DTT	Ditiotreitol
<i>E</i>	Transpiração
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
F _v /F _m	Eficiência fotoquímica do fotossistema II
GPX	Peroxidase da glutationa
<i>g_s</i>	Condutância estomática
IEF	Focalização isoeétrica
IPG	Gradiente de pH Imobilizado
KCN	Cianeto de potássio
LC	Cromatografia líquida
MF	Massa fresca
MFF	Massas frescas das folhas
MFC	Massas frescas dos caules
MFR	Massas frescas das raízes
MSF	Massas secas das folhas
MSC	Massas secas dos caules
MSR	Massas secas das raízes
MS	Massa seca
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
MT	Massa túrgida
MW	Massa molecular
NBT	<i>p</i> -nitrobluetetrazólio

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF	Número de folhas
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
Q	Quadrupolo
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Dismutase do superóxido
TCA	Ácido tricloroacético
TOF	<i>“Time-of-flight”</i> – tempo de voo
TRA	Teor relativo de água
UA	Unidade de atividade enzimática
2D	Eletroforese bidimensional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	Caracterização do Problema.....	22
1.2	Objetivos.....	25
1.2.1	<i>Objetivo Geral</i>	25
1.2.2	<i>Objetivos específicos</i>	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	Cultura do cajueiro.....	27
2.2	Enxertia.....	28
2.3	Salinização dos solos.....	29
2.4	Aspectos gerais do estresse salino no crescimento e desenvolvimento da planta.....	30
2.5	Salinidade versus trocas gasosas.....	31
2.6	Salinidade e estresse oxidativo.....	33
2.7	Salinidade e ajustamento osmótico.....	34
2.8	Proteômica de plantas sob estresse salino.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1	Material vegetal e condições gerais de cultivo.....	39
3.2	Coleta do material vegetal e análise do crescimento.....	40
3.3	Teor relativo de água.....	41
3.4	Trocas gasosas, teor relativo de clorofila e fluorescência da clorofila a.....	41
3.5	Atividade das enzimas antioxidantes.....	42
3.5.1	<i>Preparação dos extratos de folhas e raízes</i>	42
3.5.2	<i>Dismutase do superóxido</i>	42
3.5.3	<i>Peroxidase do ascorbato</i>	43
3.5.4	<i>Peroxidase do guaiacol</i>	43
3.6	Teores de solutos inorgânicos e orgânicos.....	43
3.6.1	<i>Preparação dos extratos de folhas, caules e raízes</i>	43
3.6.2	<i>Teores de Na⁺, K⁺ e Cl⁻</i>	44
3.6.3	<i>Teores de carboidratos solúveis</i>	44
3.6.4	<i>Teores de N-aminossolúveis</i>	44
3.6.5	<i>Prolina</i>	45
3.7	Padrões eletroforéticos bidimensionais.....	45
3.7.1	<i>Extração das proteínas</i>	45
3.7.2	<i>Dosagem das proteínas</i>	46
3.7.3	<i>Eletroforese bidimensional</i>	47
3.7.4	<i>Análise das imagens</i>	48
3.7.5	<i>Digestão triptica “in-gel”</i>	48
3.7.6	<i>Espectrometria de massas e identificação das proteínas</i>	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1	Crescimento e teor relativo de água.....	51
4.2	Índice SPAD, trocas gasosas e fluorescência da clorofila a.....	57
4.3	Enzimas antioxidantes.....	61
4.4	Homeostase iônica.....	64

4.5	Solutos orgânicos	69
4.6	Padrões proteicos bidimensionais	74
4.6.1	<i>Proteoma diferencial de folhas de combinações de enxerto/porta-enxerto de cajueiro anão precoce em ausência de salinidade</i>	76
4.6.2	<i>Proteoma diferencial de folhas de combinações de enxerto/porta-enxerto de cajueiro anão precoce sob estresse salino a 4,0 dS m⁻¹</i> ...	81
4.6.3	<i>Proteoma diferencial de folhas de cajueiro anão precoce porta-enxertados em resposta ao estresse salino</i>	86
4.6.4	<i>Proteínas identificadas por espectrometria de massa</i>	97
5	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS	107
	ANEXO A - Tabela 1 - Proteínas identificadas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265) de dois clones de cajueiro anão precoce, irrigadas com água destilada e com água com condutividade elétrica de 2,0 e 4,0 dS m ⁻¹ . Os <i>spots</i> obtidos por eletroforese 2D foram identificados por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF).....	125

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização do Problema

Entre os fatores abióticos que limitam a produtividade das plantas, destaca-se a salinidade no solo, a qual representa um dos mais sérios problemas para a agricultura mundial (MUNNS, 2002; FLOWERS, 2004). Segundo estimativas da FAO (2015), aproximadamente 6% das terras em todo o mundo e 23% das terras cultivadas vêm enfrentando problemas de salinização. Além disso, uma quantidade significativa de terras agrícolas tem se tornado salina devido à elevação das temperaturas climáticas e ao uso da irrigação (SZABOLCS, 1994). Em 2000, estimava-se que 19,5% das áreas irrigadas em todo o mundo enfrentavam problemas de salinidade, sendo esse percentual equivalente a 45 milhões de hectares, e no Brasil, a porcentagem dessas áreas encontrava-se entre 20 e 25%, concentrado principalmente na região Nordeste (FAO, 2000).

A falta de dados recentes e confiáveis sobre a salinização do solo pode ser atribuída à complexidade de monitoramento em nível global, à carência de infraestrutura adequada em diversos países e às mudanças climáticas, que intensificam a evaporação e alteram a dinâmica do solo. Além disso, a rápida evolução das práticas agrícolas e o aumento das temperaturas agravam o problema de salinização, como apontado por Munns (2002) e Flowers (2004). Segundo Szabolcs (1994), a salinização já era uma preocupação crescente devido ao uso da irrigação e ao aquecimento global. A FAO (2005) estimou que os prejuízos decorrentes da salinização induzida pela irrigação atingem US\$ 11 bilhões por ano, refletindo a importância de um monitoramento mais preciso e atualizado.

Nos vegetais, o estresse salino pode causar perturbações no crescimento e desenvolvimento das plantas, as quais ocorrem em função de seus componentes de natureza iônica e/ou osmótica (GREENWAY; MUNNS, 1980; HASEGAWA *et al.*, 2000). Dessa forma, o excesso de sais nos solos pode alterar os processos fisiológicos e bioquímicos da planta, resultando em distúrbios nas relações hídricas, alterações na absorção e utilização de nutrientes, além de acúmulo de íons tóxicos e seus respectivos efeitos (DIAS; BLANCO, 2010).

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) pertence à família Anacardiaceae, sendo de grande importância econômica para o Brasil, especialmente para a região Nordeste, em função do alto valor comercial e nutritivo de seus produtos. Ele é considerado uma das mais

importantes plantas cultivadas nos trópicos (CASTRO *et al.*, 2011) e, principalmente, nas regiões semiáridas. Além disso, constitui-se em uma excelente alternativa econômica, apresentando grande significado social em virtude da geração de empregos no campo durante a entressafra de culturas tradicionais como o milho, o feijão e o algodão, contribuindo, assim, para a redução do êxodo rural (CAVALCANTI *et al.*, 2008; GUANZIROLI *et al.*, 2009).

O cajueiro anão precoce é moderadamente sensível à salinidade (CARNEIRO *et al.*, 2002; CARNEIRO *et al.*, 2004; ABREU *et al.*, 2008; ALVAREZ-PIZARRO *et al.*, 2009). Entretanto, o grau de tolerância ao estresse salino depende de aspectos como o genótipo, o enxerto, o porta-enxerto, o estágio de desenvolvimento da planta, o tipo de sal e a forma de imposição do estresse.

Partindo-se do princípio que a cajucultura irrigada é uma alternativa promissora para o Nordeste, que as fontes de águas estão se tornando cada vez mais escassas e que muitas das fontes nessas regiões são de águas salobras, principalmente as provenientes de poços ou de açudes, torna-se necessário cuidados com o manejo dessas águas já que irrigações realizadas de maneiras inadequadas podem provocar salinização dos solos e, dessa forma, prejuízos para a cultura (MARQUES, 2009).

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido conduzidos com o intuito de esclarecer as principais causas dos distúrbios no crescimento e desenvolvimento das plantas, em consequência do estresse salino. Nesse contexto, além de investigar os efeitos da salinidade sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, grande parte das pesquisas está voltada para elucidar mecanismos fisiológicos e bioquímicos vinculados à tolerância ou sensibilidade ao estresse (WILLADINO *et al.*, 1999) havendo pouca informação sobre os processos moleculares básicos envolvidos na tolerância dessa cultura à salinidade.

As respostas das plantas aos sais é um fenômeno complexo e de difícil entendimento, por resultar de modificações na expressão de vários genes (HASEGAWA *et al.*, 2000). Estes, por sua vez, estão associados com diversos processos fisiológicos e bioquímicos, bem como nas alterações morfológicas e do desenvolvimento da planta (GREENWAY; MUNNS, 1980). Dessa forma, apesar de relevantes, estudos relacionados com a fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas podem não ser suficientes para revelar a complexidade dos mecanismos de tolerância à salinidade.

A proteômica tem se mostrado uma ferramenta poderosa para elucidar mecanismos de tolerância de plantas à estresses ambientais, tais como o salino (VINCENT *et al.*, 2007; SHA VALLI KHAN *et al.*, 2007). Empregando técnicas de eletroforese bidimensional (2D) combinadas com espectrometria de massas, têm-se obtido êxito na investigação do perfil

global da expressão de proteínas (WESTERMEIER; LOYLAND; ASBURY, 2002). Em trigo, estudos proteômicos demonstraram que existem variações consideráveis no perfil proteico de folhas e raízes entre variedades intimamente relacionadas que apresentam tolerância e susceptibilidade ao estresse salino (OUERGHI *et al.*, 2000; MAJOU *et al.*, 2000). Com isso, mudanças específicas no perfil proteico, onde as funções biológicas estão relacionadas com a tolerância ao estresse salino, podem ser observadas. Além disso, a análise proteômica oferece a possibilidade de identificação e caracterização funcional das proteínas diferencialmente expressas pela salinidade (ABREU, 2012).

Embora diversos estudos tenham sido conduzidos com o intuito de investigar as respostas de plantas de cajueiro ao estresse salino (CARNEIRO *et al.*, 2002; CARNEIRO *et al.*, 2004; BEZERRA *et al.*, 2007; ABREU *et al.*, 2008; ALVAREZ-PIZARRO *et al.*, 2009; AMORIM *et al.*, 2010; MARQUES *et al.*, 2011; MARQUES *et al.*, 2013), em sua grande maioria, as pesquisas estão voltadas para os campos fisiológicos e bioquímicos, existindo pouca informação sobre os processos moleculares básicos envolvidos na tolerância dessa cultura à salinidade. Nesse cenário, destaca-se a importância de estudos para elucidar o padrão de expressão de proteínas em plantas submetidas a condições de estresse salino.

Em plantas de cajueiro pouco se sabe sobre as proteínas que são alteradas em condições de estresse salino. Portanto, identificar as proteínas que são alteradas em plantas de cajueiro estressadas por sais, principalmente em diferentes clones, pode permitir o entendimento das rotas de tolerância que são ativadas nesta espécie. Estas informações, juntamente com as análises fisiológicas e bioquímicas poderiam nos fornecer respostas mais esclarecedoras sobre os mecanismos de tolerância a esse estresse abiótico.

Para uma melhor compreensão da fisiologia, bioquímica e metabolismo em plantas de cajueiro sob estresse salino, o presente trabalho visou à obtenção de informações sobre as mudanças no perfil proteico e nos processos fisiológicos e bioquímicos de plantas de cajueiro anão precoce enxertadas com quatro combinações enxerto/porta-enxerto (CCP 06/CCP 06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265) devido ao estresse salino. Baseando-se em uma abordagem proteômica comparativa entre as combinações de enxertia juntamente com exposição a níveis crescentes de sais, pretendeu-se identificar e caracterizar as proteínas envolvidas com a tolerância ao sal e correlacioná-las com as alterações ocorrentes na fisiologia e bioquímica das plantas. Estes conhecimentos serão valiosos para o entendimento dos mecanismos moleculares que controlam as respostas à salinidade, os quais poderão fornecer uma importante contribuição para o desenvolvimento ou seleção de plantas melhor adaptadas a tais condições.

1.2 Objetivos

1.2.1 *Objetivo Geral*

O presente trabalho visou obter informações sobre os aspectos fisiológicos e bioquímicos, e elaborar um perfil proteico de folhas de plantas de cajueiro anão precoce enxertadas com quatro combinações enxerto/porta-enxerto (CCP 06/CCP 06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265) submetidas ao estresse salino, objetivando identificar e caracterizar proteínas relacionadas aos mecanismos de aclimação a este estresse.

1.2.2 *Objetivos específicos*

Utilizando-se como material experimental dois clones de plantas de cajueiro anão precoce, CCP 06 e BRS 265, com quatro combinações de enxertia e sob condições de estresse salino, objetivou-se especificamente:

- Mensurar o diâmetro do enxerto e do porta-enxerto, o comprimento do caule e da raiz, número de folhas, área foliar, massa fresca e seca das folhas, caules e raízes das plantas de cajueiro anão precoce;
- Determinar o teor relativo de água das plantas de cajueiro;
- Mensurar as trocas gasosas, os teores de clorofila e a fluorescência da clorofila a em plantas de cajueiro;
- Investigar a atividade das enzimas antioxidantes SOD, APX e GPX de folhas e raízes de plantas de cajueiro;
- Determinar os teores de K^+ , Na^+ e Cl^- em folhas, caules e raízes de plantas de cajueiro;
- Mensurar os teores de carboidratos solúveis, N-aminossolúveis e prolina em folhas, caules e raízes de plantas de cajueiro;
- Elaborar mapas proteômicos reprodutíveis e de alta qualidade para tecidos foliares, avaliando as alterações nos padrões proteicos bidimensionais em concentrações crescentes de salinidade;
- Avaliar, identificar e comparar as proteínas diferencialmente expressas nos tecidos foliares dos clones porta-enxertados decorrentes do aumento na intensidade do estresse salino das plantas de cajueiro;

- Classificar funcionalmente as proteínas identificadas por espectrometria de massa e discutir a importância delas para os processos de aclimação/adaptação das plantas à salinidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura do cajueiro

O cajueiro é uma angiosperma, dicotiledônea, pertencente à família Anacardiaceae, a qual é constituída de 60 a 74 gêneros e 400 a 600 espécies (BARROS *et al.*, 1993). A espécie *Anacardium occidentale* (L.), originária do Brasil, é uma das mais dispersas de seu gênero (BARROS *et al.*, 2002). É uma planta perene que atinge 8 a 15 m de altura no tipo comum e não mais que 5 m, no tipo precoce (BARROS; CRISÓSTOMO, 1995). Tais plantas são predominantemente árvores e arbustos tropicais, subtropicais e trepadeiras, e encontram-se dispersas em diversas regiões no globo terrestre (FROTA; PARENTE, 1995; BARROS *et al.*, 2002).

O cultivo do cajueiro é encontrado em quase todo o território brasileiro, mas concentra-se principalmente nas zonas costeiras do Nordeste, que apresenta a maior diversidade cultivada de *Anacardium occidentale* (L.) (CRISÓSTOMO *et al.*, 2002). Apresenta grande variabilidade para fins agroindustriais, como produção, peso do fruto, peso da amêndoa e peso do pedúnculo, caracterizando um centro de diversidade da espécie (BARROS, 1991).

Em função de sua vasta área cultivada, a cajucultura possui destaque no contexto socioeconômico, pelo alto valor nutritivo e comercial de seus produtos, especialmente no Nordeste, onde a cultura apresenta grande relevância. Nesta região do país, segundo estimativas de 2004, a cajucultura apresentava-se responsável pela geração de emprego para 37.500 pessoas no âmbito rural e 15.000 pessoas nas indústrias de beneficiamento de castanha, que resultavam no beneficiamento de aproximadamente 280 mil toneladas por ano (OLIVEIRA, 2004). Dentre os principais produtos da cajucultura, destacam-se a produção de sucos, sorvetes, doces, licor, mel, geléias, cajuína, refrigerantes gaseificados e aguardentes, bem como o pedúnculo *in natura* (PAIVA; BARROS, 2004).

A produtividade do cajueiro se tornou ainda mais expressiva, na região Nordeste, após o surgimento da variedade “anão precoce”, que vem substituindo o cajueiro comum. Esta variedade além de proporcionar maior produtividade, uniformidade da castanha e do pedúnculo, em função de seu porte baixo, também facilita a colheita e a condução dos pomares. Todos esses fatores levaram a uma maior exploração comercial e contribuíram para o aumento da área plantada (BARROS; CRISÓSTOMO, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2002; ROSSETTI; AQUINO, 2002). Neste cenário, a cajucultura se tornou extremamente

importante para o semiárido nordestino, pois a geração de empregos no campo ocorre predominantemente na entressafra das culturas tradicionais, como milho, feijão e algodão, reduzindo, assim, o êxodo rural (CAVALCANTI *et al.*, 2008; GUANZIROLI *et al.*, 2009).

Em 2011, o estado do Ceará se destacou como o maior produtor de castanha de caju da região Nordeste, seguido do Rio Grande do Norte e Piauí. Nesse período, foi registrada uma área plantada de mais de 768.000 hectares e produção de mais de 229 mil toneladas. Em virtude da imensa produção, a castanha de caju se tornou o segundo maior produto exportado pelo Ceará, ficando atrás somente da confecção de calçados (IBGE, 2011). Os Estados Unidos, Holanda e Canadá são os principais mercados consumidores da amêndoa brasileira, sendo responsáveis por cerca de 70% das importações em 2012, onde as exportações de castanha nacional chegaram à marca de 222 milhões de dólares (SECEX-MDIC, 2012).

As plantas de cajueiro são consideradas moderadamente sensíveis à salinidade (CARNEIRO *et al.*, 2002; CARNEIRO *et al.*, 2004; ABREU *et al.*, 2008; ALVAREZ-PIZARRO *et al.*, 2009), o que tem gerado preocupações para o cultivo dessa cultura no Nordeste. Nessa região, a utilização da irrigação na cultura do caju é uma alternativa promissora, entretanto, as fontes de águas estão se tornando cada vez mais escassas e muitos dos recursos hídricos são ou vêm se tornando salinos, principalmente os provenientes de poços ou açudes. Adicionalmente, o manejo inadequado das fontes hídricas pode provocar salinização dos solos e, assim, resultar em prejuízos para a cultura (MARQUES, 2009).

2.2 Enxertia

Enxertia é a arte de unir partes de duas plantas, o enxerto e o porta-enxerto, geralmente da mesma espécie (TOMAZ *et al.*, 2006). Na combinação enxerto/porta-enxerto deve existir um equilíbrio fisiológico ou grau de afinidade entre ambas as partes de tal maneira que influencie o crescimento e a produção da nova planta (GONÇALVES, 1996). Tal equilíbrio resulta de vários mecanismos de reciprocidade entre o enxerto e o porta-enxerto, onde envolve absorção e translocação de água e nutrientes e fatores endógenos de crescimento (HARTMANN; KESTER, 1990). Porta-enxertos mais vigorosos geralmente exibem alta capacidade de absorção e translocação de água e nutrientes, bem como maior produção de substâncias estimuladoras de crescimento, o que pode favorecer o desempenho da copa (TOMAZ *et al.*, 2006).

Na maioria das espécies, combinações de enxertia podem resultar em alterações fisiológicas nas mudas, principalmente nas relações hídricas e nas trocas gasosas, as quais podem levar à adaptação/aclimatação das plantas a diferentes condições ambientais

estressantes (CASTLE *et al.*, 1989; MATOS *et al.*, 2003). Em plantios comerciais, técnicas de enxertia podem ser utilizadas para diversos fins, como maior rendimento na produção de plantas, aquisição de mudas de qualidade com crescimento uniforme, antecipação do início da produção, assim como na seleção de plantas que sejam tolerantes a problemas edafoclimáticos e/ou fitossanitários (CAVALCANTE, 2009).

Vários estudos têm sido conduzidos com o intuito de avaliar e/ou obter combinações de enxerto/porta enxerto, para a cultura do caju, que apresentem melhores respostas a diversos tipos de estresses, tanto biótico quanto abiótico, tais como salinidade (BEZERRA, *et al.*, 2002; MATOS *et al.*, 2003; FERREIRA-SILVA *et al.*, 2009), déficit hídrico (MATOS *et al.*, 2003) e patologias (CARDOSO *et al.*, 2010). Dentre os genótipos de cajueiro utilizados na agricultura, pode-se citar os clones CCP 76, CCP 09, EMBRAPA 51, BRS 189, BRS 226 e BRS 265, que são explorados comercialmente em maior intensidade para copa (BARROS *et al.*, 2002; PAIVA *et al.*, 2002; PAIVA; BARROS, 2004), e o clone CCP 06, que é utilizado como porta-enxerto devido às suas características agrônômicas superiores, especialmente sua alta resistência a estresses abióticos, como salinidade e déficit hídrico, e bióticos, como diversas patologias (CAVALCANTI *et al.*, 2000). Além disso, o CCP 06 apresenta robustez e vigor que o tornam adequado para condições adversas, além de ser altamente compatível com os principais clones comerciais de copa, como CCP 76, CCP 09 e BRS 189. Essa combinação de resistência e compatibilidade justifica sua predominância como porta-enxerto em programas de melhoramento e na produção comercial de cajueiro, promovendo um desenvolvimento mais vigoroso e produtivo nas combinações enxerto/porta-enxerto (CAVALCANTI *et al.*, 2000).

2.3 Salinização dos solos

O solo é considerado salino quando apresenta condutividade elétrica (CEa) do extrato de saturação igual ou superior a 4 dS m⁻¹, o que equivale a 40 mM de NaCl, e é caracterizado por apresentar altas concentrações de sais solúveis (USDA-ARS, 2008). Contudo, a maioria das culturas já apresenta efeitos negativos no crescimento e desenvolvimento quando cultivada em solos com CEa igual ou superior a 3,0 dS m⁻¹ (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005).

O acúmulo de sais nos solos pode ocorrer tanto por origem natural como por antropogenia. Embora ocorra naturalmente em diversas regiões, a salinização dos solos é mais frequente nas regiões áridas e semiáridas (FERNANDES *et al.*, 2010). Por outro lado, em diversas áreas de cultivo, a salinização antropogênica ocorre pela ação do homem, através da

adoção de práticas agrícolas inadequadas (SOUZA *et al.*, 2015). No Nordeste, as condições climáticas são bastante variáveis, como altas taxas de evaporação e irregularidades nas taxas de precipitação, resultando na escassez de água na maior parte dos meses do ano (QUEIROZ *et al.*, 2010).

Devido à escassez de água, os agricultores do Nordeste brasileiro têm empregado, na irrigação, o uso de água com elevadas concentrações de sais, um tipo de manejo que compromete a qualidade desse recurso e do próprio solo e, conseqüentemente, agrava severamente as práticas agrícolas (NEVES *et al.* 2009). O problema se torna ainda mais preocupante devido à ocorrência de solos com caráter sódico e solódico, que tem tornado parte dos solos inadequada para o cultivo da maioria das espécies agricultáveis, culminando no abandono das terras (RIBEIRO; FREIRE; MONTENEGRO, 2003; FERREIRA *et al.*, 2007). Evidências disso é que, em 2002, a estimativa da área salinizada no Nordeste era superior a nove milhões de hectares, localizada principalmente no Polígono das Secas, e é provável que esse número tenha alcançado valores muito maiores atualmente (MIRANDA *et al.*, 2002).

2.4 Aspectos gerais do estresse salino no crescimento e desenvolvimento da planta

O termo estresse é definido como qualquer mudança nas condições ótimas de um ser vivo, que leva a alterações em todos os seus níveis funcionais, limitando o seu desenvolvimento e reduzindo suas possibilidades de sobrevivência (LARCHER, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2013). Em seu habitat natural, as plantas estão sujeitas a condições de estresses ambientais, os quais podem ser causados por fatores bióticos ou abióticos (LARCHER, 2000). Os estresses abióticos podem ser ocasionados por inúmeros fatores, tais como radiação ultravioleta (GAO; ZHANG, 2008), metais pesados (SMEETS *et al.*, 2009), seca (SIMOVA-STOILOVA *et al.*, 2009), frio (BEVILACQUA *et al.*, 2015), altas temperaturas (FERREIRA-SILVA, 2008) e salinidade (COELHO *et al.*, 2014).

A salinidade é um dos estresses abióticos que mais afeta a produção agrícola e a distribuição geográfica de culturas de grande importância. A princípio, altas concentrações de sais no ambiente radicular reduz o potencial osmótico da solução do solo e, desta forma, restringe a capacidade de absorção de água e, conseqüentemente, o crescimento das plantas (PRISCO; GOMES-FILHO, 2010). Mais tardiamente, os sais absorvidos (principalmente Na⁺ e Cl⁻) podem se acumular e alcançar níveis de toxicidade para plantas, afetando processos fisiológicos e bioquímicos e promovendo reduções no crescimento (MUNNS, 2002).

Após absorvidos pelas plantas, os íons tóxicos podem ser translocados para as folhas, pelo fluxo transpiratório, onde se acumulam em altas concentrações. O acúmulo de cloreto e sódio no protoplasma causa vários distúrbios, afetando a cadeia respiratória, a fotofosforilação, a assimilação de nitrogênio e o metabolismo das proteínas (MUNNS, 2002). Dentre os processos afetados pelo excesso de sais nas plantas, destacam-se a síntese de proteínas, o metabolismo dos lipídios e a fotossíntese (BEZERRA *et al.*, 2003).

O nível com que a salinidade irá afetar as plantas vai depender de fatores intrínsecos ao indivíduo (espécie, cultivar e estágio fenológico), fatores relacionados ao estresse (tipo e concentração do sal, tempo de exposição aos sais e modo de aplicação) e fatores ambientais (granulometria do solo, composição iônica, luz, temperatura e umidade relativa do ar), bem como da interação entre eles (GREENWAY; MUNNS, 1980; MUNNS; TERMAAT, 1986; SHANNON; GRIEVE, 1999; BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNYK, 2000).

Diversos estudos demonstraram que o estresse salino afeta a absorção e a assimilação de vários nutrientes essenciais (KANT *et al.*, 2007; CARILLO *et al.*, 2008), e que o acúmulo excessivo de íons nos tecidos, especialmente nas folhas velhas, causa injúrias na planta e, possivelmente, a sua morte. Os efeitos negativos da toxicidade iônica podem ser decorrentes da capacidade limitada das células para compartimentalizar os íons tóxicos no vacúolo, o que gera altas concentrações no citosol, bem como em algumas organelas, e interfere severamente nos processos metabólicos citados anteriormente (MUNNS, 2002, 2005). Tal processo tem sido citado como o principal motivo para os decréscimos na produtividade da maioria das espécies cultivadas sob condições de estresse salino.

Enquanto algumas espécies apresentam elevada tolerância à salinidade (halófitas), outras são altamente susceptíveis (glicófitas), sendo que a maioria das espécies cultivadas tem seu crescimento inibido ou retardado pela salinidade, mesmo em baixas concentrações de sais (GREENWAY; MUNNS, 1980; CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005; YAMAGUCHI; BLUMWALD, 2005). As halófitas desenvolveram mecanismos adaptativos (tolerância ao acúmulo de sais e glândulas de sal), no decorrer da evolução, que as tornaram mais eficientes em habitar solos salinos. Já as glicófitas não desenvolveram tais mecanismos e apresentam maior sensibilidade à salinidade (GREENWAY; MUNNS, 1980; PARDO; QUINTERO, 2002).

2.5 Salinidade *versus* trocas gasosas

A fotossíntese é um dos principais processos fisiológicos afetados pelo estresse salino. Os efeitos deletérios iniciais da salinidade podem ser decorrentes de fatores estomáticos, pela

redução da disponibilidade de CO₂, como consequência da limitação da difusão estomática e mesofílica (BRUGNOLI; LAUTERI, 1991; FLEXAS *et al.*, 2004). Com o aumento da exposição aos sais, a salinidade afeta a fotossíntese por fatores não estomáticos, pela redução do conteúdo total de clorofila, do transporte de elétrons nos cloroplastos e, conseqüentemente, por implicações na eficiência da maquinaria fotossintética (YAN *et al.*, 2012). Tais efeitos são resultantes do acúmulo dos íons Na⁺ e/ou Cl⁻ nos cloroplastos, que alteram negativamente os processos bioquímicos e fotoquímicos envolvidos na fotossíntese (PLAUT, 1995; CHARTZOULAKIS *et al.*, 2002; PARIDA; DAS; MITTRA, 2003; AZEVEDO NETO *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2012; ROMERO-ARANDA; SORIA; CUARTERO, 2001).

Os pigmentos fotossintéticos são bons indicadores do nível de estresse nas plantas (HENDRY; PRICE, 1993), desta forma, seus teores são constantemente monitorados ao longo do período de estresse, por meio de estimativas da concentração de clorofila (PESTANA *et al.*, 2001). Com a degradação dos pigmentos fotossintéticos, a energia absorvida excede a energia assimilada e este desbalanço pode intensificar a produção de ROS e a fotoinibição. A fotoinibição se origina de distúrbios no transporte de elétrons através da CTE nos tilacóides do cloroplasto, que são ocasionados principalmente por danos no fotossistema II (PSII), reduzindo sua eficiência fotoquímica para receber e transportar elétrons (BAKER, 2008).

Estudos voltados para as trocas gasosas de plantas frutíferas têm sido intensificados nos últimos anos, avaliando-se os processos de fixação de CO₂, transpiração e condutância estomática (GULZAR; KHAN; UNGAR, 2003). Dentre as principais culturas tropicais estudadas, destacam-se o cajueiro, goiabeira, caramboleira, cupuaçuzeiro, entre outras (NOGUEIRA; MORAES; BURITY, 2000). Na maioria dos estudos, plantas de cajueiro anão precoce apresentaram reduções drásticas nas taxas de fotossíntese (*A*), condutância estomática (*gs*) e transpiração (*E*) quando expostas ao estresse salino (BEZERRA *et al.*, 2003; BEZERRA *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 2010); contudo, Amorim *et al.* (2010) reportaram que plantas adultas de cajueiro anão precoce, cultivadas em condições de campo, não apresentaram alterações drásticas nos parâmetros de trocas gasosas (*A*, *E* e *gs*) em função do aumento da salinidade.

A fluorescência da clorofila *a* tem se tornado um ponto central para a avaliação dos efeitos de estresses ambientais sobre a eficiência fotoquímica do aparato fotossintético (KALAJI *et al.*, 2011). A seleção de espécies de plantas que apresentam maior tolerância à salinidade, utilizando a abordagem da fluorescência da clorofila *a*, tem se revelado uma estratégia eficaz para avaliar a resposta das plantas a condições de estresse salino.

De acordo com Azevedo-Neto *et al.* (2011), essa técnica permite a mensuração da eficiência fotoquímica do aparato fotossintético de forma não destrutiva, fornecendo informações sobre a saúde das plantas sob estresse. Além disso, Glynn, Fraser e Gillian (2003) destacam que a fluorescência da clorofila *a* é instrumental na identificação de genótipos que se sobressaem pela resistência à salinidade, possibilitando a seleção de variedades que otimizam sua produção de energia mesmo em solos salinos. Por exemplo, essa abordagem tem sido utilizada para identificar variedades de arroz, como "IR64", que mantêm a eficiência fotossintética sob estresse salino (ISMAIL; HORIE, 2009), e variedades de cevada, como "Tadorna", que demonstraram maior tolerância à salinidade (MUNNS; TESTER, 2008). Além disso, híbridos de milho, como "Pioneer 30F35", mostraram capacidade de manutenção da fotossíntese em condições salinas (ZHANG *et al.*, 2012). No caso do cajueiro, o clone "CCP 06" se destaca por sua eficiência fotossintética em ambientes salinos (CAVALCANTI *et al.*, 2000).

Essa abordagem não apenas facilita a identificação de cultivares mais adaptadas, mas também contribui para o entendimento dos mecanismos fisiológicos utilizados pelas plantas para lidar com a salinidade, promovendo avanços no melhoramento genético e na seleção de culturas mais resilientes a condições adversas. Tal ferramenta se torna extremamente útil, uma vez que medidas simultâneas de fluorescência da clorofila *a* e de trocas gasosas possibilitam conhecimentos mais claros sobre os efeitos da salinidade sobre o aparato fotossintético durante o crescimento e desenvolvimento vegetal (BACARIN; MOSQUIN, 2002; ABREU, 2012).

2.6 Salinidade e estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produtos do metabolismo normal das células, porém os desajustes metabólicos da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria e cloroplastos, causados pelo excesso de sais, resultam numa produção excessiva delas (MITTLER *et al.*, 2011). O estresse salino induz à superprodução de ROS, as quais são prejudiciais para as células das plantas quando em concentrações elevadas de sais, causando danos oxidativos a membranas celulares e várias moléculas biológicas (PANG; WANG, 2008). As ROS compreendem tanto radicais livres (radical superóxido - $\cdot\text{O}_2$; radical hidroxil - $\cdot\text{OH}$; radical hidroperóxido - $\text{HO}\cdot_2$; e radical alcóxil - $\text{RO}\cdot$) quanto formas moleculares (peróxido de hidrogênio - H_2O_2 ; e oxigênio singlete - $^1\text{O}_2$) (GILL; TUTEJA, 2010). Os principais sítios de produção das ROS em plantas submetidas ao estresse são os cloroplastos, os peroxissomos e as mitocôndrias (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Nos cloroplastos, durante a fotossíntese, o O_2 produzido pode atrair os elétrons que são carreados na cadeia transportadora de elétrons (CTE) do cloroplasto, formando o $\cdot O_2$, este é rapidamente convertido a H_2O_2 pela dismutase do superóxido (SOD) (GECHEV *et al.*, 2006).

Os peroxissomos, provavelmente, são os principais locais de formação de H_2O_2 . Há pelo menos dois sítios de produção de H_2O_2 nos peroxissomos das plantas, um na matriz da organela, catalisado pela enzima oxidase da xantina (XOD), que catalisa a conversão da xantina ou hipoxantina em ácido úrico e $\cdot O_2$, e, o segundo, na membrana do peroxissomos, onde ocorre uma pequena CTE composta por uma flavoproteína NADH e Cyt b (DEL RÍO *et al.*, 2002).

Nas mitocôndrias, pode haver produção em excesso de H_2O_2 através da respiração (NOCTOR; DE PAEPE; FOYER, 2007). A principal fonte de geração de ROS nessa organela é a CTE mitocondrial, a qual possui elétrons com energia livre suficiente para reduzir diretamente o O_2 . Os locais de produção de $\cdot O_2$ são os complexos I e III da CTE mitocondrial, moléculas que são posteriormente reduzidas a H_2O_2 , pela SOD (RHOADS *et al.*, 2006; NOCTOR; DE PAEPE; FOYER, 2007). O H_2O_2 sintetizado pode reagir na presença de Fe^{2+} ou Cu^{2+} (Reação de Fenton), resultando na formação de radicais $\cdot OH$, que podem reagir com ácidos nucleicos e proteínas, gerando danos oxidativos às células (GRENE, 2002; SHARMA *et al.*, 2012).

Para evitar os efeitos tóxicos das ROS, as plantas desenvolveram um sistema antioxidativo complexo, que compreende tanto componentes enzimáticos como não enzimáticos (ABOGADALLAH, 2010; OLIVEIRA, 2013). O sistema antioxidativo enzimático é composto pelas enzimas SOD (E.C. 1.15.1.1), catalase (CAT; E.C. 1.11.1.6), peroxidase do ascorbato (APX; E.C. 1.11.1.11), peroxidase do guaiacol (GPX; E.C. 1.11.1.7) e peroxirredoxina (PrxR; E.C. 1.11.1.15) (MITTLER *et al.*, 2004). Já o sistema antioxidante não enzimático inclui moléculas orgânicas como o ácido ascórbico, glutathiona (GSH), α -tocoferol, carotenoides e flavonoides (GILL; TUTEJA, 2010).

2.7 Salinidade e ajustamento osmótico

O ajustamento osmótico é o processo pelo qual o potencial osmótico é reduzido, em resposta ao acúmulo de solutos orgânicos e inorgânicos, resultando na diminuição do potencial hídrico, sem que ocorram reduções na turgescência celular. Este processo tem a finalidade de manter a absorção de água pelas plantas, sendo um mecanismo de defesa contra diversos estresses ambientais (LARCHER, 2000; MELONI *et al.*, 2004).

O ajustamento osmótico pode contribuir para a manutenção de processos fisiológicos importantes, como a abertura estomática, expansão celular e fotossíntese (NEUMANN; VOLKENBURGH; CLELAND, 1988). Em geral, os solutos orgânicos e inorgânicos são acumulados no citosol e/ou no vacúolo, equilibrando desta forma o potencial osmótico e hídrico das células. Os solutos orgânicos, em sua grande maioria, são carboidratos solúveis, álcoois, N-aminossolúveis, sais sulfônicos terciários e sais de amônio quaternários (ASHRAF; HARRIS, 2004; AZEVEDO-NETO *et al.*, 2004). O acúmulo de íons inorgânicos, como Na^+ , K^+ e Cl^- , também tem sido bastante reportado para plantas sob estresse salino (ABREU *et al.*, 2008; MARQUES *et al.*, 2011; FEIJÃO *et al.*, 2013).

O ajustamento osmótico varia conforme a espécie, cultivares de uma mesma espécie, órgãos e tecidos de uma mesma planta e até mesmo entre os diferentes compartimentos de uma célula (MUNNS, 2002). Além disso, o acúmulo desses solutos inorgânicos deve ser restrita ao vacúolo ou, do contrário, pode causar intumescimento do protoplasma, afetar atividades enzimáticas, causar alterações quantitativas e qualitativas no metabolismo; resultando em baixa produção de energia, distúrbios na assimilação do nitrogênio e alterações no padrão de aminoácidos e no metabolismo das proteínas (ARAÚJO, 2013).

A prolina é um aminoácido, que pode atuar na osmorregulação de plantas sob estresse, que tem recebido maior atenção pelos pesquisadores. Seu acúmulo é induzido por uma variedade de estresses, tanto bióticos como abióticos, e sua homeostase é controlada pela biossíntese e/ou diminuição na sua oxidação (HARE; CRESS, 1997; HARE; CRESS; VAN STADEN, 1999; KUMAR; REDDY; SUDHAKAR, 2003). Embora ainda haja controvérsias, vários estudos têm proposto que o acúmulo de prolina em tecidos vegetais de plantas é um importante mecanismo de tolerância ao estresse salino. Tais pesquisas demonstraram que, além de estar relacionado com o ajustamento osmótico, este aminoácido pode contribuir para a estabilização de membranas e proteínas, atuar na sinalização celular, promover a eliminação de radicais livres, participar do equilíbrio de oxirredução e na indução da expressão de genes (ASHRAF; HARRIS, 2004).

2.8 Proteômica de plantas sob estresse salino

O termo “proteômica” foi empregado pela primeira vez na década de 90 (WILKINS *et al.*, 1996) e durante os últimos anos vem se destacando nas pesquisas científicas. A proteômica fornece um perfil global das proteínas dos mais diversos sistemas biológicos, além de permitir a caracterização e análise de suas modificações em resposta às perturbações ambientais, oferecendo detalhes sobre o perfil, a quantificação, as modificações pós-

tradicionais e as interações proteína-proteína (BAGINSKY, 2009; VANDERSCHUREN *et al.*, 2013). Nos últimos anos, a análise da população de proteínas expressas (proteoma) tem se tornado uma ferramenta promissora para o entendimento das funções das proteínas e da modulação de genes responsáveis pelos processos de adaptação das plantas aos estresses ambientais (RAMPITSCH; SRINIVASAN, 2006).

Nos últimos anos, com o advento das técnicas de separação de proteínas por eletroforese 2D e identificação por espectrometria de massas, a proteômica tem avançado consideravelmente (WESTERMEIER; LOYLAND; ASBURY, 2002). A princípio, a proteômica foi largamente utilizada em estudos qualitativos, caracterizando o perfil proteico das proteínas dos mais diversos tecidos e organelas pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE). No entanto, com o desenvolvimento da espectrometria de massas e de análises de alto rendimento, foi possível empregar a proteômica em estudos quantitativos (SCHULZE; USADEL, 2010; RABILLOUD; LELONG; 2011). Em conjunto, essas técnicas são primordiais em todo estudo proteômico, principalmente naqueles que empregam uma abordagem comparativa com o propósito de caracterizar as diferenças no proteoma ocasionadas por diferentes estímulos; como mudanças no estágio de desenvolvimento e/ou estresses ambientais (ABREU, 2012).

Um conjunto de proteínas separadas no gel 2D resulta em um mapa proteômico, onde pode-se identificar a superexpressão ou a inibição da expressão de proteínas fisiologicamente importantes nas condições analisadas, pois, como se sabe, nem todas as proteínas são expressas simultaneamente nos sistemas vivos (MESQUITA, 2010). Após eletroforese 2D, as proteínas identificadas como diferencialmente expressas são analisadas por espectrometria de massas, através de equipamentos como o do tipo MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-flight*). O grupo de massas moleculares, adquirido a partir do espectrômetro de massas, é alinhado contra bancos de proteínas traduzidas e clivadas *in silico* ou contra bancos peptídicos (mass-fingerprinting) disponíveis mundialmente, tais como NCBI-nr (*National Center for Biotechnology Information - non redundant*) (RAMPITSCH; SRINIVASAN, 2006; SHEVCHENKO *et al.*, 2001).

A proteômica tem se tornado uma ferramenta útil no melhoramento genético de plantas, uma vez que proporciona a identificação de proteínas responsivas a condições ambientais adversas. Nesse sentido, os recentes avanços na proteômica têm possibilitado o estudo de processos biológicos dinâmicos em um organismo sob determinada condição, proporcionando o mapeamento de rotas metabólicas e a identificação de novos genes alvos que podem ser usados na manipulação genética (PANDEY; MANN, 2000; PATTERSON;

AEBERSOLD, 2003). Assim, a proteômica tem fornecido bases moleculares para a descoberta de novos marcadores moleculares relacionados a estresses abióticos (como seca, temperatura e salinidade) e bióticos (como doenças e pragas) (KONISHI; ISHIGURO; KOMATSU, 2001; SULE *et al.*, 2004; DANI *et al.*, 2005).

A seleção dos spots proteicos para espectrometria de massas (MS) é realizada com base em critérios que garantem a identificação precisa das proteínas de interesse, especialmente aquelas diferencialmente expressas entre os tratamentos e o controle. O processo de seleção ocorre após a análise bidimensional do perfil proteico e envolve a escolha de spots que apresentem variações significativas em sua expressão. Essas variações podem incluir o aumento ou diminuição do volume relativo da proteína, assim como o aparecimento ou desaparecimento de spots em resposta às condições experimentais, como estresse salino ou outro fator (SHEN *et al.*, 2002).

A razão principal para a seleção de spots para MS é a identificação de proteínas que desempenham papéis chave na resposta ao tratamento experimental. Proteínas que surgem exclusivamente após a aplicação de um tratamento ou que demonstram mudanças expressivas em sua abundância, em comparação ao controle, são indicativas de um envolvimento direto em processos adaptativos ou de resposta ao estresse. Portanto, essas proteínas são selecionadas para serem analisadas por MS com o objetivo de determinar sua composição peptídica e identificar suas funções biológicas e metabólicas (RABILLOUD, 1997)..

Além disso, a seleção cuidadosa de spots minimiza o risco de analisar proteínas que possam não ter relevância biológica para a condição estudada, ou que estejam envolvidas em processos não relacionados ao experimento. Dessa forma, o foco recai sobre proteínas que apresentam um papel diferencial comprovado, com base em análises estatísticas robustas, como ANOVA ($p \leq 0,05$), que confirmam a significância das alterações nos volumes dos spots entre os tratamentos (RABILLOUD, 1997). Essa abordagem também permite a identificação de proteínas que são potenciais biomarcadores de estresse ou adaptação, facilitando a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos.

Por fim, a análise dos spots selecionados por MS proporciona informações detalhadas sobre a massa molecular e o ponto isoelétrico das proteínas, que são comparados aos dados teóricos para confirmação da identificação. Esse processo garante a precisão dos resultados e contribui para a validação dos achados no contexto do estudo das respostas fisiológicas ou metabólicas ao tratamento aplicado (RABILLOUD, 1997) .

Como descrito anteriormente, a resposta das plantas à estresses ambientais ocorre em vários níveis moleculares e é de natureza multigênica. Este fenômeno inicia-se com a

percepção do sinal, seguida pela ativação de genes específicos e finaliza com a codificação de proteínas que atuam na proteção das células/organismo contra os efeitos adversos do estresse (ZHU, 2001; SAIRAM; TYAGI, 2004). Levando em consideração que as proteínas são as moléculas biologicamente ativas na defesa das plantas, recentemente, vários pesquisadores vêm utilizando a abordagem proteômica para estudar as alterações no perfil proteico de plantas expostas à salinidade, como reportado em gergelim (*Sesamum indicum*; GEHLOT; PUROHIT; SHEKHAWAT, 2005), arroz (*Oryza sativa*; SALEKDEH *et al.*, 2002), trigo (*Triticum durum*; CARUSO *et al.*, 2008) e feijão (*Vigna unguiculata*; ABREU *et al.*, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições gerais de cultivo

O presente experimento foi conduzido em casa de vegetação e as análises fisiológicas e bioquímicas foram realizadas nos Laboratórios de Fisiologia Vegetal 1 e 2 do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC). Para a realização deste experimento foram utilizados dois clones de cajueiro anão precoce enxertados com quatro combinações enxerto/porta-enxerto, sendo: CCP 06/CCP 06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 (Figura 1).



Figura 1 – Visão geral do experimento conduzido em casa de vegetação com dois clones de cajueiro anão precoce porta-enxertados, com quatro combinações enxerto/porta-enxerto, sendo CCP 06/CCP 06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265, e três tratamentos salinos, um tratamento controle (água destilada) e dois tratamentos com soluções salinas com condutividades elétricas (CEa) de 2,0 e 4,0 dS m⁻¹.

As mudas dos clones foram provenientes do Campo Experimental da EMBRAPA Agroindústria Tropical, localizado em Pacajus, Ceará-Brasil. As mudas enxertadas, com aproximadamente três meses de idade, foram transplantadas para vasos contendo 7 litros de areia (solo). Os vasos plásticos utilizados possuíam um volume de 9 litros e foram furados na base para drenagem. Para o preparo do solo, este foi submetido a lavagens sucessivas, sendo realizadas em pequenas porções, para a retirada de impurezas e reduzir o seu índice salino; as

primeiras oito lavagens, foram feitas cada uma com 1,0 L de água do sistema de abastecimento local e as duas últimas, cada uma com 0,5 L de água destilada. Para manutenção dos clones foi aplicada solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950) e água destilada em dias alternados por um período de dez dias após o transplante para o estabelecimento das mudas. Após esse período foram iniciados os tratamentos que consistiram de irrigação com água destilada (controle) e soluções salinas com condutividades elétricas (CEa) de 2,0 e 4,0 dS m⁻¹.

As plantas foram irrigadas todos os dias, ao final da tarde, por um período de 60 dias, fornecendo-se, manualmente, 250 mL de solução salina ou água destilada, por vaso, para cada um dos respectivos tratamentos, visando possibilitar uma drenagem de aproximadamente 20% de volume de lixiviação. Além disso, uma vez por semana as plantas foram irrigadas com solução nutritiva ao invés de água destilada ou solução salina. Os sais utilizados para a preparação das soluções salinas foram NaCl, CaCl₂.2H₂O e MgCl₂.6H₂O, na proporção de 7:2:1, relação esta predominante nas principais fontes de água disponíveis para irrigação no Nordeste brasileiro, conforme Medeiros (1992), obedecendo-se a relação entre CEa e a concentração dos sais de 1 mmol_c L⁻¹ = CEa x 10, segundo RHOADES *et al.* (2000).

Durante o experimento, as medidas de temperatura e de umidade relativa do ar no interior da casa de vegetação foram monitoradas diariamente com o auxílio de um termohigrógrafo, sendo observados os valores médios, respectivamente, de 28,3 ± 0,6 °C e 75,8 ± 2,0%.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, obedecendo a um arranjo fatorial 4 x 3, correspondendo a quatro combinações enxerto/porta-enxerto, e três qualidades de água de irrigação, isto é, dois tratamentos salinos (CEa = 2,0 e 4,0 dS m⁻¹) e um controle (irrigação com água destilada). O experimento foi realizado com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de uma planta por vaso. Assim, cada planta correspondeu a uma parcela experimental, perfazendo um total de 60 plantas. Os resultados foram expressos pela média ± erro padrão das repetições de cada tratamento. Os dados foram examinados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi realizada por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade (p ≤ 0,05). O programa utilizado para as análises estatísticas e para a construção dos gráficos foi o software SigmaPlot 11.0.

3.2 Coleta do material vegetal e análise do crescimento

As plantas foram coletadas após 60 dias do início dos tratamentos. Antes da coleta, no período da manhã, entre 8:00 e 10:00h, foram realizadas as medidas de diâmetro do enxerto e

do porta-enxerto, com um paquímetro digital. Após a coleta, o comprimento do caule e da raiz, com uma régua graduada em centímetros e o número de folhas (NF) obtido por contagem manual. Posteriormente, as plantas foram divididas em folhas, caules e raízes. Nessa ocasião, foi determinada a área foliar (AF), por meio de um medidor de área foliar (mod. LI-3100, LI-COR, Lincoln, NE, USA). A segunda folha completamente expandida, a contar do ápice, foi utilizada para a retirada dos discos foliares para a determinação do teor relativo de água. Em seguida, foram determinadas as massas frescas das folhas restantes (MFF), levando-se em conta a massa retirada dos discos foliares, dos caules (MFC) e das raízes (MFR), as quais foram congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, em seguida, liofilizadas. Após a liofilização, foram determinadas as massas secas das folhas (MSF), dos caules (MSC) e das raízes (MSR), levando-se em consideração a massa retirada inicialmente das folhas. O material liofilizado foi então macerado em almofariz, com auxílio de nitrogênio líquido, e armazenado em frascos de vidro a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior utilização.

3.3 Teor relativo de água

Para a determinação do teor relativo de água (TRA), foram coletados 10 discos foliares de 1,0 cm de diâmetro, os quais foram pesados em balança analítica para a obtenção da massa fresca (MF). Posteriormente, os discos foliares foram transferidos para tubos de ensaio contendo água destilada e deixados imersos por 24 horas. Posteriormente, os discos foram removidos e colocados entre duas folhas de papel de filtro, sendo pressionados levemente para eliminar o excesso de água e, imediatamente, pesados para a obtenção da massa túrgida (MT). Logo após, os discos foram colocados em sacos de papel e postos em estufa de circulação forçada de ar a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, por aproximadamente 48 h, até atingir peso constante, sendo, em seguida, pesados para a determinação da massa seca dos discos foliares (MS). O teor relativo de água foi calculado pela equação: $\text{TRA} = 100 [(MF - MS)/(MT - MS)]$, sendo expresso em percentagem.

3.4 Trocas gasosas, teor relativo de clorofila e fluorescência da clorofila a

Um dia antes da coleta, entre 8:00 e 10:00 h, foram medidas a taxa de fotossíntese líquida (A), a condutância estomática (g_s), a taxa de transpiração (E) e a eficiência de carboxilação da Rubisco (A/C_i), onde C_i corresponde a concentração interna de CO_2 , na segunda folha completamente expandida, a contar da base, utilizando-se um analisador de gás no infravermelho (IRGA, mod. LCI, ADC, Hoddesdon, UK), portando uma fonte de luz com intensidade de $1.200\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ (PSU, ADC, Hoddesdon, UK). Os teores relativos de

clorofila foram determinados, entre 10:00 e 12:00 h, por meio de método não-destrutivo, através de leituras realizadas com um medidor de clorofila portátil (SPAD-502, Minota Co., Ltd Osaka, Japan), nas mesmas folhas utilizadas para a determinação das trocas gasosas. Em cada planta foram realizadas três leituras e os resultados foram expressos em unidades, fornecidas pelo próprio aparelho.

A emissão de fluorescência da clorofila a foi medida na segunda folha completamente expandida, a partir da base, entre 14:00 e 16:00 h, com um fluorômetro portátil (Plant Efficiency Analyser, Hansatech, England, UK), após 30 min de adaptação das folhas ao escuro, sendo determinados a fluorescência máxima (F_m) e a fluorescência variável (F_v) para estimar a relação F_v/F_m que mensura a eficiência fotoquímica do fotossistema II.

3.5 Atividade das enzimas antioxidantes

3.5.1 Preparação dos extratos de folhas e raízes

O extrato para determinação da atividade das enzimas dismutase do superóxido, peroxidase do ascorbato e peroxidase do guaiacol foi obtido a partir da homogeneização, em almofariz, do pó liofilizado de folhas e de raízes com solução-tampão tris-HCl a 50 mM, pH 8,0, contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0,1 mM por 4,0 minutos, sendo utilizados 3,0 mL de solução-tampão para 100 mg de material liofilizado. Para a extração da APX, a solução-tampão de extração conteve, adicionalmente, ascorbato a 2 mM. O homogeneizado foi centrifugado a $12.000 \times g$, durante 15 min. Todos os procedimentos foram realizados a 4 °C e o sobrenadante (extrato) foi armazenado a -25 °C até o momento das análises.

3.5.2 Dismutase do superóxido

A atividade da dismutase do superóxido (SOD; EC 1.15.1.1) foi determinada de acordo com o método de Beauchamp e Fridovich (1971). A mistura reacional foi composta por 1.000 µL de tampão-fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,8, contendo EDTA a 0,1 mM e metionina a 19,5 mM, 150 µL de azul de p-nitrobluetetrazólio (NBT) a 750 µM, 300 µL de riboflavina a 10 µM e 50 µL do extrato bruto convenientemente diluído, em um volume final de 1,5 mL. A reação foi conduzida em uma câmara de reação revestida internamente com papel alumínio a 25 °C e iluminada com duas lâmpadas fluorescentes de 20 W, por 15 min (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A atividade foi estimada através do aumento da absorvância em 560 nm, devido à produção de formazana azul, resultante da fotorredução do

NBT. Os resultados foram expressos em UA g⁻¹ MS, sendo uma UA (unidade de atividade enzimática) definida como sendo a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da fotorredução do NBT, no período de 15 min.

3.5.3 Peroxidase do ascorbato

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX; EC 1.11.1.11) foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981). Foram adicionados 300 µL do extrato enzimático, convenientemente diluído, a uma mistura de reação constituída de 50 µL de ascorbato a 15 mM e 50 µL de H₂O₂ a 30 mM, em 1.100 µL de solução-tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 6,0, contendo EDTA a 0,05 mM. Determinou-se a atividade da enzima pela oxidação do ascorbato, medida pelo decréscimo na absorvância em 290 nm. Os resultados foram expressos em µmol H₂O₂ min⁻¹ g⁻¹ MS, usando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do ascorbato ($\epsilon = 0,0028 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e a estequiometria da reação (dois moles de ascorbato para um mol de H₂O₂).

3.5.4 Peroxidase do guaiacol

A atividade da peroxidase do guaiacol (GPX; EC 1.11.1.7) foi determinada pelo método de Kar e Mishra (1976). Foram adicionados 50 µL de extrato diluído a uma mistura de reação composta por 950 µL de solução-tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0 contendo EDTA a 0,1 mM, 500 µL de guaiacol a 20 mM e 500 µL de H₂O₂ a 60 mM. A reação foi acompanhada pelo incremento da absorvância em 470 nm, devido à formação do tetraguaiacol. Os resultados foram expressos em µmol H₂O₂ min⁻¹ g⁻¹ MS, usando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol ($0,266 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e a estequiometria da reação (cada mol de tetraguaiacol envolve o consumo de quatro moles de H₂O₂).

As atividades das enzimas SOD, APX e GPX representam a média de cinco repetições, sendo cada repetição dosada em duplicata.

3.6 Teores de solutos inorgânicos e orgânicos

3.6.1 Preparação dos extratos de folhas, caules e raízes

O extrato empregado para a determinação dos teores de solutos inorgânicos e orgânicos foi preparado segundo Cataldo *et al.* (1975), com pequenas modificações. Para isso, 50 mg do pó liofilizado de folhas, caules e raízes, foram homogeneizados com 5 mL de água desionizada seguindo-se à incubação em banho-maria a 75 °C, por 1 h, com agitações a cada

15 min. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a $3.000 \times g$ por 15 min, sendo o sobrenadante resultante coletado e filtrado em papel de filtro e armazenado a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior utilização.

3.6.2 Teores de Na^+ , K^+ e Cl^-

Os íons Na^+ e K^+ foram determinados por fotometria de chama, segundo Malavolta; Vitti e Oliveira (1989). Para a determinação de Cl^- , a 3,0 mL do extrato, convenientemente diluído, foram adicionados 0,5 mL da mistura formada por tiocianato de mercúrio [$\text{Hg}(\text{SCN})_2$] a 13,2 mM, em metanol absoluto, e nitrato férrico [$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$] a 20,2%, em água desionizada, na proporção de 4:1. Após agitação vigorosa, os tubos permaneceram em repouso por 15 min, sendo as concentrações de cloreto estimadas através de leituras de absorvância em 460 nm, utilizando-se NaCl como padrão. Como branco, foi utilizado um tubo de ensaio contendo água desionizada, em substituição ao extrato (GAINES; PARKER; GASCHO, 1984).

Para as determinações de Na^+ e K^+ , foram feitas três leituras no fotômetro de chama para cada repetição, enquanto que para as de Cl^- cada repetição foi dosada em duplicata. Os teores de Na^+ , K^+ e Cl^- foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS.

3.6.3 Teores de carboidratos solúveis

Os carboidratos solúveis foram determinados de acordo com Dubois *et al.* (1956). A mistura de reação foi constituída por 0,2 mL do extrato convenientemente diluído, 0,2 mL de fenol a 5% em água destilada (v/v) e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Para o branco foi utilizado uma mistura formada por 0,2 mL de água desionizada em substituição ao extrato, acrescida dos demais reagentes empregados na reação. A mistura foi agitada vigorosamente e deixada em repouso por 15 min para atingir a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a quantificação dos carboidratos solúveis através das medidas de absorvância em 490 nm, utilizando-se como padrão uma curva feita com a D(+) glicose anidra. Os teores de carboidratos solúveis foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS, a partir da média de cinco repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

3.6.4 Teores de N-aminossolúveis

Os teores de N-aminossolúveis foram determinados pelo método de Yemm e Cocking (1955). A mistura de reação foi constituída por 0,5 mL do extrato convenientemente diluído,

0,25 mL de solução-tampão citrato de sódio a 0,2 M (pH 5,0), 0,5 mL de cianeto de potássio (KCN) a 0,2 mM em metilcelosolve a 100% (v/v) e 0,1 mL de ninhidrina a 5% também em metilcelosolve a 100% (v/v). Em seguida, os tubos foram fechados, agitados e mantidos em banho-maria a 95 °C, por 15 min. A reação foi interrompida por meio de resfriamento em banho de gelo (4 °C) e, em seguida, foram adicionados 0,65 mL de etanol a 60% (v/v). Os teores de N-aminossolúveis foram estimados através de leituras de absorvância em 570 nm, tendo como branco 0,5 mL de água desionizada (em substituição ao extrato) e os demais constituintes do meio de reação. A curva padrão foi feita a partir de soluções com concentrações crescentes de glicina. Os teores de N-aminossolúveis obtidos foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS, a partir da média de cinco repetições, sendo cada extrato dosado em duplicata.

3.6.5 Prolina

Os teores de prolina foram determinados de acordo com o método de Bates *et al.* (1973), que tem como base a reação com a solução de ninhidrina ácida (1,25 g de ninhidrina, em 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico a 6,0 M). Em tubos de ensaio com tampas rosqueadas, foram adicionados 0,5 mL do extrato apropriadamente diluído, 0,5 mL de ninhidrina ácida e 0,5 mL de ácido acético glacial, sendo a mistura aquecida a 100 °C, por 1 h, para o desenvolvimento da cor. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo por 10 min para interromper a reação. Após o resfriamento, foram adicionados aos tubos 1,0 mL de tolueno, os quais foram agitados vigorosamente e deixados em repouso. Após repouso e formação de uma mistura bifásica, a fase superior (cromóforo + tolueno) foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur para quantificação de prolina, o que foi feito através de leituras de absorvância em 520 nm, sendo o tolueno usado como branco. Os teores de prolina foram estimados tendo como referência uma curva padrão de L-prolina, sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS, a partir da média de cinco repetições. Cada extrato foi dosado em duplicata.

3.7 Padrões eletroforéticos bidimensionais

3.7.1 Extração das proteínas

As proteínas solúveis totais de folhas foram extraídas a partir de uma mistura composta das cinco repetições de cada tratamento e de acordo com o método proposto por Shen *et al.* (2002), com algumas modificações. Cerca de 200 mg do pó liofilizado de folhas

foram homogeneizados em almofariz com 200 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e 5 mL de solução-tampão de extração tris-HCl a 40 mM (pH 7,5), contendo sacarose a 250 mM, EDTA a 10mM, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) a 1,0 mM, ditioneitol (DTT) a 1,0 mM e Triton X-100 a 1% (v/v). Após a homogeneização, as amostras foram mantidas sob agitação por 1 h, a 4 °C e centrifugadas a $15.000 \times g$, durante 15 min a 4 °C, sendo o sobrenadante coletado. Para a precipitação das proteínas, foram adicionados ao sobrenadante ácido tricloroacético (TCA) dissolvido em acetona gelada de modo a resultar em uma concentração final de 6,7%, posteriormente as amostras foram mantidas por 12 h, a -20 °C. Decorrido esse tempo, procedeu-se a uma nova centrifugação a $15.000 \times g$, durante 15 min a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado lavado quatro vezes com 5 mL de acetona gelada. Cada etapa de lavagem do precipitado constou da ressuspensão do precipitado com acetona, seguida de agitação vigorosa em vortex e centrifugação a $15.000 \times g$, por 15 min. O precipitado final foi seco a vácuo, e solubilizado em 300 μ L de solução-tampão de lise, contendo uréia a 7 M, tiouréia a 2 M, detergente Zwitteriônico (CHAPS) a 2% (m/v), IPG buffer 4-7 (v/v) a 2% e DTT (m/v) a 1%, sendo a mistura mantida sob agitação constante à temperatura ambiente, por 1 h (RABILLOUD *et al.*, 1997). Após isso, as amostras foram centrifugadas a $12.000 \times g$, durante 10 min, a 25 °C. O sobrenadante (extrato proteico) foi recolhido, e utilizado para as análises de eletroforese bidimensional.

3.7.2 Dosagem das proteínas

Para determinar a quantidade de proteína a ser utilizada nas eletroforeses; determinou-se a concentração de proteína nos extratos proteicos, descritos acima, utilizando-se o método desenvolvido por Bradford (1976). Para isso, a uma alíquota de 0,1 mL do extrato, convenientemente diluído, foi adicionado 1,0 mL do reagente de coomassie brilliant blue G-250 (Sigma Aldrich, USA). A reação foi conduzida à temperatura ambiente, por 15 min. A concentração de proteína foi estimada através da medida da absorbância em 595 nm, utilizando-se como branco a mistura formada de 0,1 mL de água desionizada e 1,0 mL do reagente de coomassie blue. As concentrações de proteína foram determinadas em triplicata para cada preparação de fração proteica, sendo a albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, USA) utilizada como padrão para a curva de calibração.

3.7.3 Eletroforese bidimensional

A primeira dimensão ou focalização isoeétrica (IEF) foi realizada em fitas de 13 cm em gradiente de pH imobilizado (Immobiline DryStrip, pH 4-7, GE-Healthcare). Para isso, as fitas contendo 0,5 mg de proteína das amostras, foram reidratadas por um período de 18 h em bandeja de reidratação (Immobiline DryStrip Reswelling Tray), contendo 250 μ L de solução-tampão contendo uréia a 8 M, CHAPS a 2% (m/v), IPG buffer 4-7 a 2% (v/v), DTT a 0,3% e azul de bromofenol a 0,002% (m/v) (GE Healthcare: Life sciences, EUA). A focalização isoeétrica foi realizada utilizando o aparelho IPGphor III (GE Healthcare: Life sciences, EUA), à temperatura constante de 20 °C, sendo a corrida realizada em cinco passos: 1. 200 V por 1 hora; 2. 500 V por 1 hora; 3. 800 V x h em gradiente de até 1.000 volts; 4. 11.300 V x h em gradiente de até 8.000 volts; e 5. 5.400 V x h em passo único de 8.000 volts. A amperagem máxima foi de 50 μ A/fita. Após a focalização, as tiras foram equilibradas sob agitação em solução-tampão de equilíbrio, contendo tris-HCl a 50 mM (pH 8,8), uréia a 6 M, glicerol a 30% (v/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2% (m/v), azul de bromofenol a 0,002% (m/v) e DTT a 1% (m/v), por 15 min, e em seguida, incubadas com o mesmo tampão adicionado de iodoacetamida a 2,5% (m/v), durante 15 min.

A segunda dimensão foi realizada em um sistema convencional SDS-PAGE vertical (LAEMMLI, 1970), utilizando um aparelho de eletroforese vertical SE600 Rubi (GE Healthcare Life sciences, EUA), sendo o sistema alimentado pela fonte EPS 3501XL (Amersham Biosciences, Sweden). Para isso, as fitas, após focalização isoeétrica, foram fixadas no topo do gel de poliacrilamida a 12,5% (p/v) (dimensões de 16 x 18 cm) e seladas com uma solução de agarose a 0,5% (v/v) e azul de bromofenol a 0,0002% (m/v). Em cada uma das fitas de gel foi aplicada uma mistura de proteínas com massas moleculares conhecidas (MW Marker Kit Range: 14.400-97.000, GE Healthcare: Life sciences, EUA). A eletroforese, para cada gel, foi realizada no módulo *step* a 15 mA durante 30 min, seguida de 25 mA até o azul de bromofenol atingir o final do gel. Após a eletroforese, as proteínas foram fixadas no gel com uma solução contendo 10% de ácido acético (v/v) e 40% de etanol (v/v), durante 12 h, e coradas com coomassie blue G-250 coloidal a 0,1% (m/v) (NEUHOFF *et al.*, 1988), por 72 h. Os géis foram mantidos em solução de ácido acético 2% (v/v), para posterior digitalização e análise das imagens; e identificação por espectrometria de massa dos *spots* proteicos de interesse.

3.7.4 *Análise das imagens*

Os géis foram digitalizados utilizando-se o programa LabScan v. 5.0 (GE-Healthcare) no ImageScanner III (GE Healthcare: Life sciences, USA) e as imagens obtidas analisadas no programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE-Healthcare, USA). Através desse programa, foram estimados os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada *spot*. Para cada tratamento foram preparados três géis, dos quais um foi selecionado como o gel de referência. A fim de minimizar distorções nas análises, as imagens foram padronizadas, utilizando-se as configurações de escala de cinza e formato MEL com resolução de 300 dpi. A detecção dos *spots* foi realizada com subtração do fundo e detecção automática (contraste de 5%, área mínima de 5% e saliência de 100), seguida de correções manuais. Os géis tiveram seus *spots* iguais ligados por meio de “landmarks” e identificados numericamente. Em seguida, os valores de volumes gerados pelo programa para cada *spot*, foram usados para os cálculos de correlação. As proteínas foram consideradas diferencialmente expressas quando a ANOVA foi significativa ($p \leq 0,05$) e a variação na porcentagem de volume (índice de variação) entre os tratamentos foi de pelo menos 1,4 vezes (média entre os géis) ou devido ao aparecimento ou desaparecimento do *spot*, em qualquer um dos tratamentos. Os géis bidimensionais de cada uma das combinações de enxertia (CCP 06/CCP 06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265) foram comparados entre si, tanto para o tratamento controle como para tratamento de C.E. 4,0 dS m⁻¹. Para cada combinação de enxertia foi realizado comparações entre os níveis de tratamento salino (o controle foi comparado a cada um dos tratamentos salinos, C.E.= 2,0 e 4,0 dS m⁻¹, bem como, foi feita comparações entre eles). Um total de 24 comparações foi realizado, sendo utilizado um total de 36 géis bidimensionais para a análise de comparações.

3.7.5 *Digestão triptica “in-gel”*

As proteínas classificadas como diferencialmente expressas foram excisadas dos géis bidimensionais com o auxílio de ponteiras esterilizadas de 1000 µL, com as pontas cortadas de acordo com o tamanho dos *spots* e transferidas para tubos eppendorfs de 200 µL, onde foi realizada a digestão com tripsina, de acordo com o método proposto por Shevchenko *et al.* (2006), com algumas modificações. Os fragmentos de gel foram descorados com solução de bicarbonato de amônio a 25 mM em acetonitrila (ACN) a 50% (v/v), pH 8,8. Foram realizadas três lavagens com 200 µL da solução descorante. Em seguida, os pedaços de géis foram desidratados por duas vezes em ACN a 100% por 5 min e, em seguida, a solução foi

removida completamente por meio de secagem por 10 min em um concentrador a vácuo (SpeedVac, Concentrador plus, Eppendorf). Os pedaços de gel foram tratados com 100 μL de DTT (um agente redutor) a 65 mM em bicarbonato de amônio a 100 mM (m/v) por 30 min, à temperatura de 56 °C. Posteriormente, os géis foram tratados com 100 μL de iodoacetamida (agente alquilante) a 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM (m/v), no escuro, por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas duas sequências de lavagens com soluções de reidratação de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 min e de desidratação com 200 μL de ACN a 100% por 5 min; seguidas de uma nova lavagem com ACN 100% por 5 min e completa desidratação do gel em concentrador a vácuo por 10 minutos. Os pedaços de géis secos foram reidratados por 45 min, a 4 °C, com 15 μL do tampão de digestão contendo bicarbonato de amônio a 40 mM em ACN a 10% (v/v) e tripsina (Promega, Madison, WI, USA) na concentração de 20 ng μL^{-1} . Após esta etapa, foram adicionados 50 μL da solução de bicarbonato de amônio a 40 mM em ACN a 10% (v/v), sendo a digestão das proteínas conduzida por um período de 17 h a 37 °C. Posteriormente, os peptídeos foram extraídos dos géis com 30 μL de solução de ácido fórmico a 5% (v/v) em ACN 50% (v/v), por duas vezes, com auxílio de um sonicador (Eco-Sonics, Ultrasonique). As proteínas/peptídeos foram transferidas para microtubos limpos e concentradas em concentrador a vácuo (Concetrador plus, Eppendorf). Posteriormente, 20 μL de ácido fórmico a 0,1% foram adicionados em cada microtubo, agitados em vortex e centrifugados por 15 min a 10000 x g. O sobrenadante foi transferido para tubos (“vials”) e, utilizado para a identificação das proteínas/peptídeos por espectrometria de massas.

3.7.6 Espectrometria de massas e identificação das proteínas

Os fragmentos da digestão tríptica foram analisados por espectrometria de massas sequencial com ionização por Eletrospray, acoplada a cromatografia líquida (LC-ESI-MS/MS). Foi utilizado um espectrômetro de massas híbrido de alta resolução Q-TOF (Waters Corp., Milford, MA, EUA), acoplado a um sistema de cromatografia líquida (Nano-high-performance, UPCL). Os dados brutos obtidos foram processados no programa Protein Lynx versão 2.0 (Waters Corp., MA, USA) e convertidos em arquivos de micromassa (.PKL) contendo as massas e intensidades dos peptídeos detectados para pesquisa no banco de dados.

Para identificar as proteínas, os dados de PMF (*Peptide Mass Fingerprint*) e MS/MS foram submetidos ao programa de busca MASCOT (Matrix Science, London, UK), utilizando como bancos de dados o NCBI (National Center for Biotechnology Information) não-redundante e o SwissProt, ambos restringidos para Viridiplantae (Green Plants). Todos os

peptídeos foram assumidos como sendo monoisotópicos e protonados $[M+H]^+$. Os outros parâmetros de busca foram: variação da massa do peptídeo de $\pm 1,2$ Da, variação da massa MS/MS de $\pm 0,6$ Da, carga de peptídeos de +1, +2 ou +3, um sítio perdido de clivagem da tripsina, carbamidometilação da cisteína e oxidação parcial da metionina. Para a identificação das proteínas foram utilizados como critérios o mínimo de três peptídeos pareados, correlação entre os bancos de dados e “scores” das proteínas dado pelo MASCOT ($p < 0,05$). Os pontos isoelétricos (pI) e as massas moleculares (MW), teórico e experimental, foram comparados para as proteínas encontradas. Além disso, as localizações subcelulares, as vias metabólicas e funções biológicas que as proteínas estão envolvidas foram pesquisadas no Uniprot (www.uniprot.org/), bem como em periódicos especializados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Crescimento e teor relativo de água

Com o objetivo de verificar se combinações de enxerto/porta-enxerto de dois genótipos de cajueiro anão precoce (CCP 06/CCP 06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265) reduz os efeitos deletérios do estresse salino no crescimento das plantas, determinaram-se as seguintes variáveis: diâmetro do caule do enxerto e do porta-enxerto; comprimento do caule e da raiz principal; número de folhas (NF), área foliar (AF), massas frescas das folhas (MFF), caules (MFC) e raízes (MFR), bem como as massas secas das folhas (MSF), caules (MSC) e raízes (MSR).

O estresse salino não afetou significativamente o diâmetro do enxerto do caule em todas as combinações enxerto/porta-enxerto avaliadas (Figura 2A). Contudo, sob condições de salinidade, plantas enxertadas na combinação BRS 265/CCP 06 apresentaram maiores valores de diâmetro do caule do enxerto quando comparadas às demais combinações de enxertia (Figura 2A).

A salinidade à 4,0 dS m⁻¹ aumentou o diâmetro do caule do porta-enxerto das combinações BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265, em relação ao controle, enquanto que não promoveu alterações significativas nas enxertias CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265 (Figura 2B). Além disso, somente a 4,0 dS m⁻¹ é que houve diferença significativa entre as combinações, sendo as plantas BRS 265/CCP 06 as que apresentaram maiores valores de diâmetro do caule do porta-enxerto. Segundo Mesquita *et al.* (2004), a avaliação do diâmetro do caule é um fator relevante para a análise de crescimento, por se tratar de uma variável que pode expressar o vigor da planta. Nesse sentido, o aumento do diâmetro do caule e dos ramos tem influência direta no crescimento do câmbio vascular, o qual é responsável pela formação de novas camadas do floema e xilema.

Em relação ao estresse salino, as combinações de enxertia que apresentaram reduções significativas no comprimento do caule foram CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265 (Figura 2C). Na primeira delas, foram observadas reduções de 20,5 e 33,3% nos tratamentos de 2,0 e 4,0 dS m⁻¹, respectivamente, enquanto que na segunda, houve redução de 23,3% no tratamento de 4,0 dS m⁻¹, em relação aos seus respectivos controles.

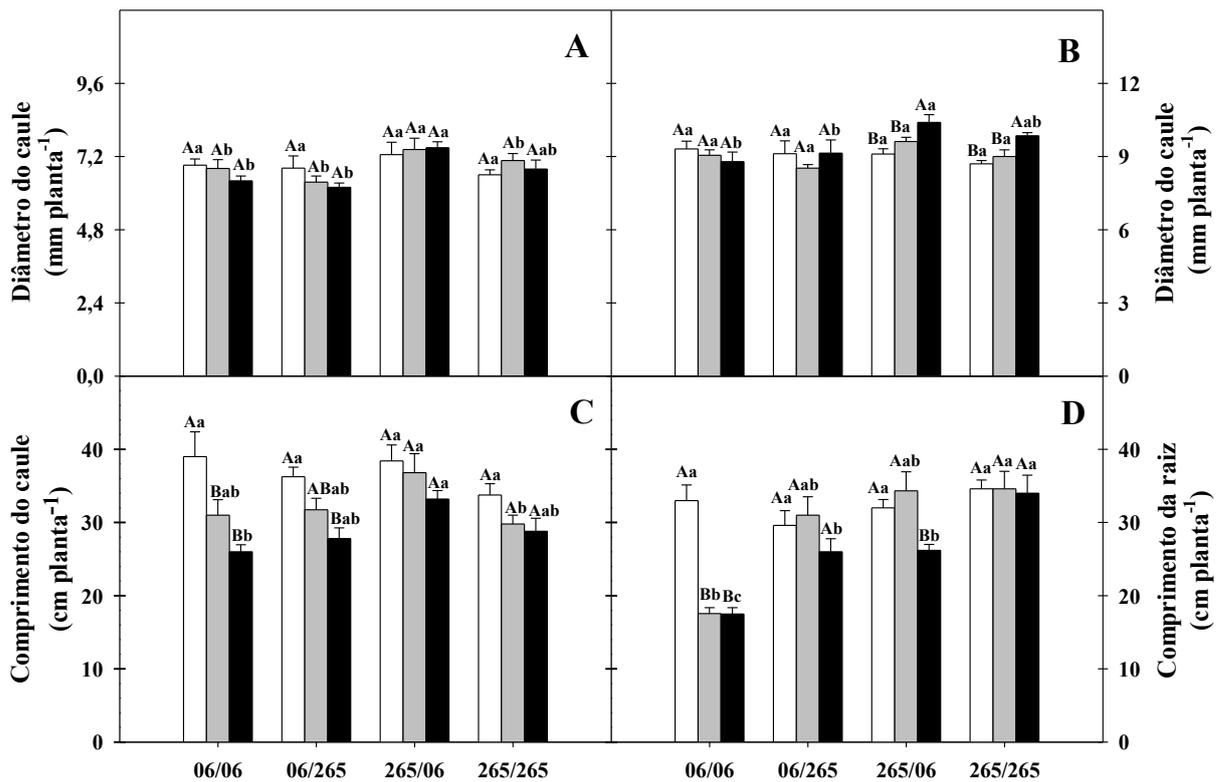


Figura 2. Diâmetro do caule do enxerto (A) e do porta-enxerto (B) e comprimento do caule (C) e da raiz (D) de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), irrigadas por 60 dias com água destilada (controle - □) e com água salina com condutividade elétrica de 2,0 (■) e 4,0 (■) dS m⁻¹. Letras maiúsculas diferentes, dentro de cada combinação de enxertia, e letras minúsculas diferentes, no mesmo tratamento salino, representam diferenças significativas decorrentes do estresse salino e da combinação de enxerto/porta-enxerto, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras representam o desvio padrão.

Em relação às enxertias, no controle, não foi observada diferença significativa no comprimento do caule. Já nos demais tratamentos, a única diferença significativa foi encontrada entre as combinações BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265, a 2,0 dS m⁻¹, e entre BRS 265/CCP 06 e CCP 06/CCP 06, a 4,0 dS m⁻¹, e nos dois casos, os maiores valores dessa variável foram observados no BRS 265/CCP 06 (Figura 2C).

O comprimento da raiz nas combinações CCP 06/BRS 265 e BRS 265/BRS 265 não foi afetado pela salinidade. Já na combinação BRS 265/CCP 06 foi observada redução significativa de 18,1% entre o controle e o tratamento salino a 4,0 dS m⁻¹. Por outro lado, a combinação CCP 06/CCP 06 foi a que mais sofreu com a salinidade, apresentando redução média de 47,0% no comprimento da raiz, em ambos os tratamentos salinos, em relação ao controle (Figura 2D).

Todas as combinações de enxertia sofreram reduções significativas no número de folhas em função da salinidade, sendo esse efeito mais evidente a 4,0 dS m⁻¹. Ao se comparar

os tratamentos controle e 4,0 dS m⁻¹, as combinações que sofreram menor e maior redução foram BRS 265/CCP 06 (30,4%) e CCP 06/CCP 06 (86,1%), respectivamente (Figura 3A). Na ausência de estresse, a combinação que apresentou o maior número de folhas foi a CCP 06/CCP 06, porém foi a que também apresentou os maiores decréscimos percentuais pelo estresse salino. Em contraste, plantas BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 foram as menos afetadas pela salinidade, sendo os efeitos detectados somente a 4,0 dS m⁻¹ (Figuras 3A).

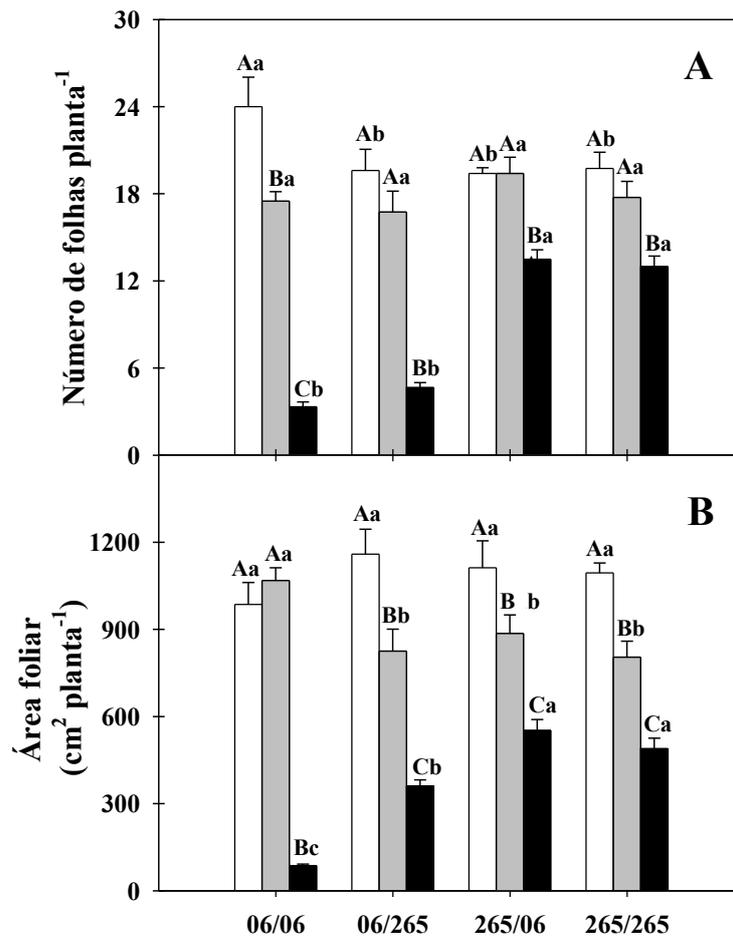


Figura 3. Número de folhas (A) e área foliar (B) de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), irrigadas por 60 dias com água destilada (controle -□) e com água salina com condutividade elétrica de 2,0 (■) e 4,0 (■) dS m⁻¹. Letras maiúsculas diferentes, dentro de cada combinação de enxertia, e letras minúsculas diferentes, no mesmo tratamento salino, representam diferenças significativas decorrentes do estresse salino e da combinação de enxerto/porta-enxerto, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão.

Os decréscimos registrados no número de folhas ocorreram principalmente em decorrência da abscisão foliar, mais do que pela inibição do crescimento (dados não mostrados), como evidenciado na Figura 4. Vale destacar, que a inibição provocada pelo estresse salino se torna mais prejudicial quando resulta em menor expansão foliar e/ou

redução do número de folhas, que pode também ser ocasionado pela morte de folhas mais velhas. Tais processos refletem negativamente nas taxas de fotossíntese líquida, prejudicando os processos fisiológicos e bioquímicos das plantas (MUNNS, 2002; GOMES *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2012).

O estresse salino, tanto a 2,0 quanto a 4,0 dS m^{-1} , reduziu drasticamente a área foliar das plantas de cajueiro de todos os tratamentos, exceto na combinação CCP 06/CCP 06 a 2,0 dS m^{-1} (Figura 3B). Contudo, as maiores reduções pela salinidade foram registradas nas plantas estressadas a 4,0 dS m^{-1} na combinação CCP 06/CCP 06, com valores 91,2% menores que os do respectivo controle. Em contraste, a combinação BRS 265/CCP 06 foi a menos afetada pela salinidade de 4,0 dS m^{-1} , com decréscimos de 50,3% em relação ao controle (Figura 3B).

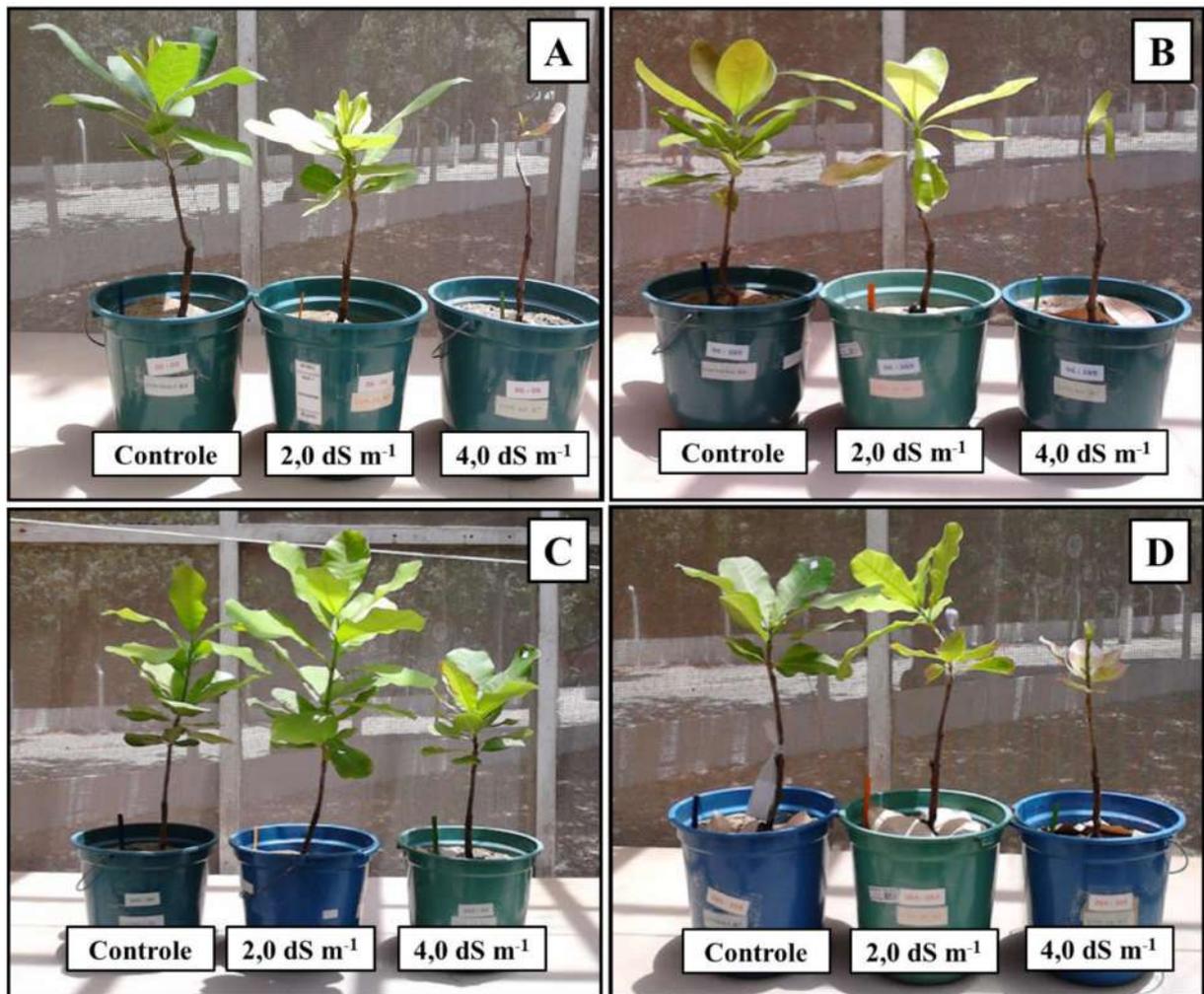


Figura 4. Aparência fenotípica de plantas de cajueiro anão precoce com diferentes combinações de enxertia, após 60 dias de cultivo na ausência (controle) e presença de estresse salino a 2,0 e 4,0 dS m^{-1} . **A** - CCP 06/CCP 06, **B** - CCP 06/BRS 265, **C** - BRS 265/CCP 06 e **D** - BRS 265/BRS 265.

A área foliar é um importante parâmetro de crescimento, uma vez que está relacionada à área disponível para a fotossíntese e tem efeitos diretos na produção de carboidratos e de biomassa, sendo um componente essencial para a produtividade das plantas (SEVERINO *et al.*, 2004). Em glicófitas, é um dos parâmetros mais sensíveis a estresses ambientais, como salinidade e estresse hídrico, pois a redução na área foliar atua como mecanismo de defesa para evitar altas taxas de transpiração e, conseqüentemente, a perda excessiva de água em solos salinizados ou com baixa disponibilidade hídrica (HEUER, 1997; NOBRE *et al.*, 2003).

De modo similar ao reportado neste estudo com plantas enxertadas, Alvarez-Pizarro (2006) observou reduções drásticas pela salinidade na área foliar de plantas de cajueiro anão precoce, não enxertadas, de diversos clones (CCP 06, CCP 09, CCP 76, E51 e BRS 189), com os menores valores, sob estresse, detectados no clone CCP 06. Adicionalmente, resultados similares têm sido reportados em diversos estudos de enxertia com espécies vegetais sob condições de estresse salino, tais como graviola (NOBRE *et al.*, 2003), acerola (GURGEL *et al.*, 2003), citrus (FERNANDES *et al.*, 2011) e goiaba (SOUZA *et al.*, 2015).

De modo geral, na ausência de estresse salino, as variáveis de massa fresca e massa seca não foram alteradas pelos tratamentos de enxertia, exceto para as massas frescas do caule (MFC) e das raízes (MFR) e a massa seca da raiz (MSR) da combinação de enxertia BRS 265/BRS 265, que apresentaram valores menores que aqueles das demais combinações (Figura 5). As plantas da enxertia CCP 06/CCP 06 e BRS 265/CCP 06 não mostraram alterações pela salinidade de 2,0 dS m⁻¹ nas massas fresca (MFF) e seca das folhas (MSF) (Figura 5A e B), ao passo que as combinações CCP 06/BRS 265 e BRS 265/BRS 265 apresentaram reduções médias de 29% em relação aos respectivos controles. Já a 4,0 dS m⁻¹ todas as combinações de enxertia apresentaram reduções massivas nas MFF e MSF, sendo os maiores decréscimos médios detectados na combinação CCP 06/CCP 06 (92%), seguida das combinações CCP 06/BRS 265 (65%), BRS 265/BRS 265 (48%) e BRS 265/CCP 06 (42%) (Figura 5A e B).

Nos caules e raízes, alterações significativas pelos tratamentos salinos foram observadas somente nas combinações CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265, exceto na MFR da combinação BRS 265/CCP 06 a 4,0 dS m⁻¹ (Figura 5C, D, E e F). Entretanto, em termos absolutos, os maiores valores dos parâmetros de crescimento, sob estresse salino a 4,0 dS m⁻¹, foram registrados nas plantas provenientes da enxertia BRS 265/CCP 06, independente do órgão analisado. Assim, os dados obtidos fornecem evidências que a combinação enxerto/porta-enxerto BRS 265/CCP 06 foi a que se destacou com melhor crescimento sob estresse salino.

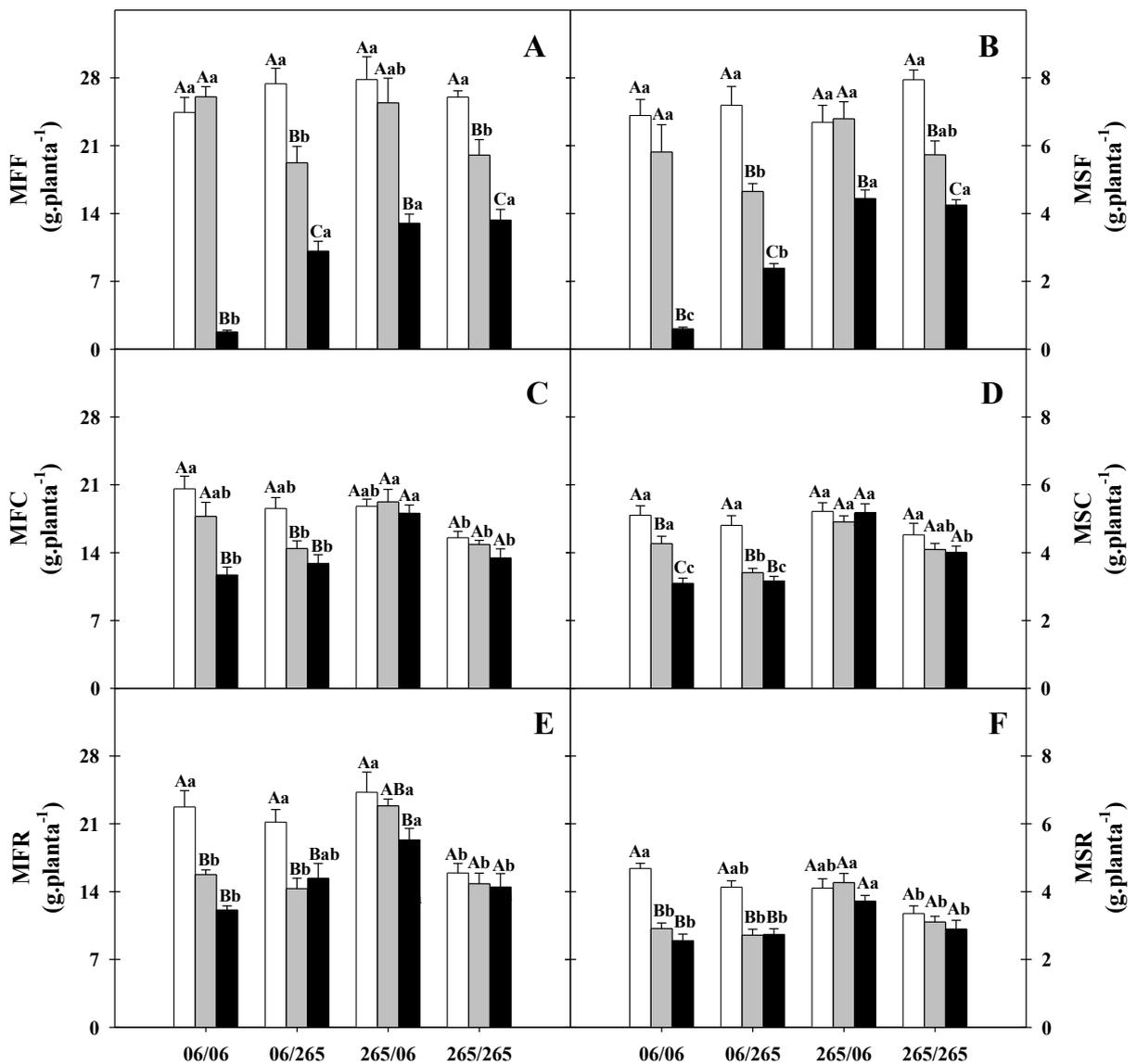


Figura 5. Massa fresca das folhas (MFF, **A**), massa seca das folhas (MSF, **B**), massa fresca do caule (MFC, **C**), massa seca do caule (MSC, **D**), massa fresca das raízes (MFR, **E**) e massa seca das raízes MSR, (**F**) de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), irrigadas por 60 dias com água destilada (controle - □) e com água salina com condutividade elétrica de 2,0 (■) e 4,0 (■) dS m^{-1} . Letras maiúsculas diferentes, dentro de cada combinação de enxertia, e letras minúsculas diferentes, no mesmo tratamento salino, representam diferenças significativas decorrentes do estresse salino e da combinação de enxerto/porta-enxerto, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão.

O crescimento das plantas é resultado da integração de uma gama de processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares. Tais processos são afetados negativamente pelo estresse salino, resultando em efeitos severos no crescimento das plantas. Nesse contexto, nos últimos anos, a busca por espécies/genótipos que conseguem crescer e produzir economicamente em solos salinizados tem sido intensificada. Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que a estratégia de enxertia pode influenciar na tolerância de plantas de

cajueiro anão precoce ao estresse salino, sendo a combinação dos clones BRS 265 (como enxerto) e CCP 06 (como porta-enxerto) a que proporcionou melhor crescimento as plantas sob alta salinidade.

De modo geral, o teor relativo de água se manteve inalterado pela salinidade, com exceção das plantas da enxertia BRS 265/BRS 265 estressadas a 4,0 dS m⁻¹, que apresentaram valores 34% menores que os do controle (Figura 6). Além disso, plantas desse mesmo tratamento mostraram os menores valores de teor relativo de água, em relação às demais combinações de enxertia, independente do estresse salino.

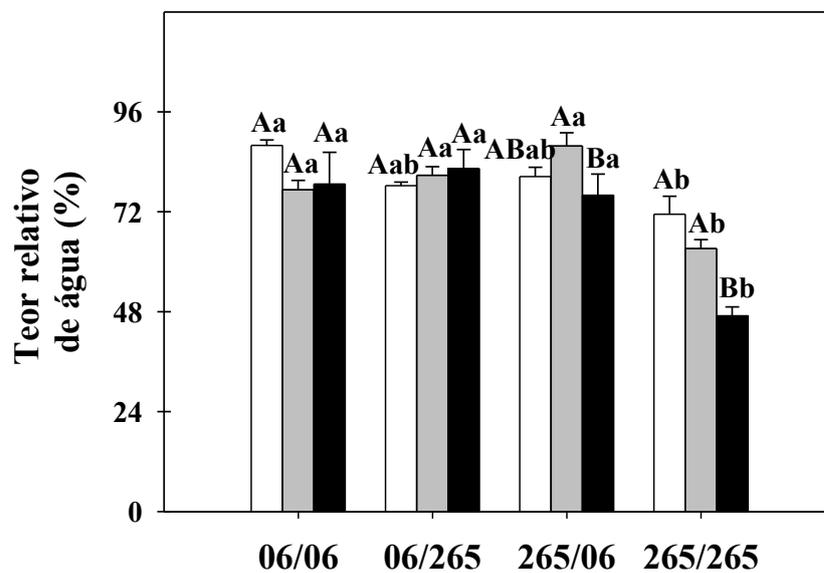


Figura 6. Teor relativo de água de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), irrigadas por 60 dias com água destilada (controle - □) e com água salina com condutividade elétrica de 2,0 (▒) e 4,0 (■) dS m⁻¹. Letras maiúsculas diferentes, dentro de cada combinação de enxertia, e letras minúsculas diferentes, no mesmo tratamento salino, representam diferenças significativas decorrentes do estresse salino e da combinação de enxerto/porta-enxerto, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão.

4.2 Índice SPAD, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

Na ausência de salinidade, os índices relativos de clorofila total, estimada pelo índice SPAD, não apresentaram variações significativas em função das combinações de enxertia (Figura 7). Em contraste, o estresse salino reduziu significativamente o índice SPAD das plantas de todos os tratamentos de enxertia, sendo os efeitos mais conspícuos nas combinações CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265 a 4,0 dS m⁻¹, que apresentaram teores relativos de clorofila total 53 e 70% menores que os respectivos controles. Adicionalmente,

sob estresse salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, os maiores valores do índice SPAD foram detectados na combinação BRS 265/CCP 06, seguida das combinações BRS 265/BRS 265, CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265, respectivamente.

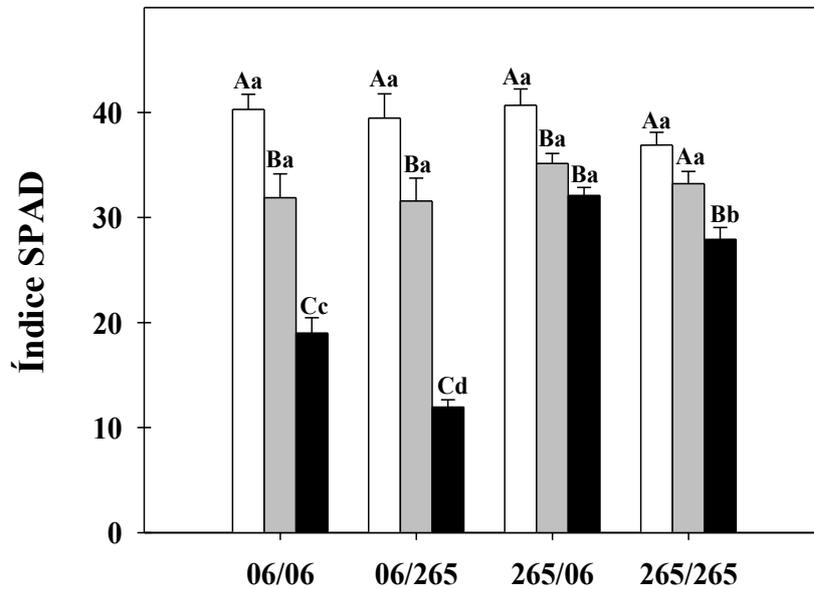


Figura 7. Índice SPAD de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), irrigadas por 60 dias com água destilada (controle - □) e com água salina com condutividade elétrica de $2,0$ (▒) e $4,0$ (■) dS m^{-1} . Letras maiúsculas diferentes, dentro de cada combinação de enxertia, e letras minúsculas diferentes, no mesmo tratamento salino, representam diferenças significativas decorrentes do estresse salino e da combinação de enxerto/porta-enxerto, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão.

As alterações decorrentes do estresse salino nos teores relativos de clorofila *a* (índice SPAD) das plantas de cajueiro anão precoce (Figura 7) foram concordantes com as variações na fotossíntese líquida (*A*) (Figura 8A). Na salinidade à $2,0 \text{ dS m}^{-1}$, as plantas das combinações de enxertia CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265 apresentaram decréscimos nos valores de *A* de 32 e 42%, respectivamente, quando comparadas com o controle, enquanto que não foram registradas variações significativas nas combinações BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265. Já a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, todos os tratamentos de enxertia apresentaram reduções significativas em *A* em relação aos respectivos controles; contudo, os maiores valores de *A* nessa condição de salinidade foram detectados nas plantas BRS 265/CCP 06 (Figura 8A).

As taxas de condutância estomática (g_s) e de transpiração (E) apresentaram comportamentos similares àquele de fotossíntese líquida (Figura 8B e 8C). Embora os

tratamentos salinos (2,0 e 4,0 dS m⁻¹) tenham reduzido severamente essas variáveis em todas as combinações de enxertia, os maiores e menores decréscimos médios foram observados nas plantas CCP 06/BRS 265 e BRS 265/CCP 06, respectivamente. Em relação à eficiência de carboxilação da rubisco, esta também apresentou comportamento similar aos de *A*, sendo os maiores valores observados na enxertia BRS 265/CCP 06 (Figura 8D).

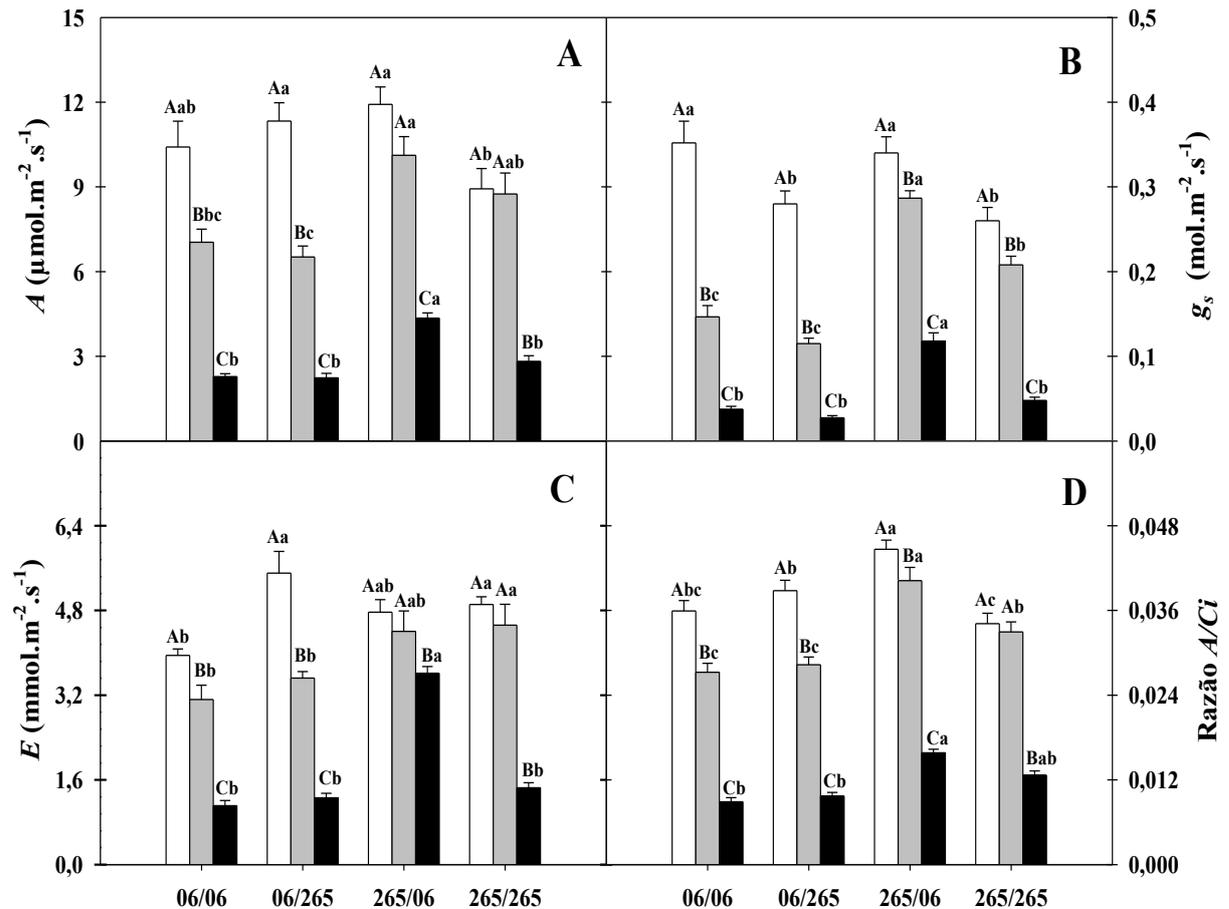


Figura 8. Fotossíntese líquida (*A*, **A**), condutância estomática (*g_s*, **B**), transpiração (*E*, **C**) e eficiência de carboxilação (**D**) de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), irrigadas por 60 dias com água destilada (controle - □) e com água salina com condutividade elétrica de 2,0 (■) e 4,0 (■) dS m⁻¹. Letras maiúsculas diferentes, dentro de cada combinação de enxertia, e letras minúsculas diferentes, no mesmo tratamento salino, representam diferenças significativas decorrentes do estresse salino e da combinação de enxerto/porta-enxerto, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão.

A eficiência quântica do fotossistema II (relação *F_v/F_m*) foi reduzida pela salinidade a 2,0 dS m⁻¹ somente nas plantas da combinação CCP 06/BRS 265, ao passo que a 4,0 dS m⁻¹ todas as combinações de enxertia apresentaram relações *F_v/F_m* inferiores àquelas dos tratamentos controles (Figura 9). Adicionalmente, em termos absolutos, os maiores valores de

eficiência quântica do fotossistema II a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$ foram registrados nas plantas BRS 265/CCP 06, que foram correlacionados com o melhor desempenho fotossintético e crescimento das plantas desse tratamento sob salinidade.

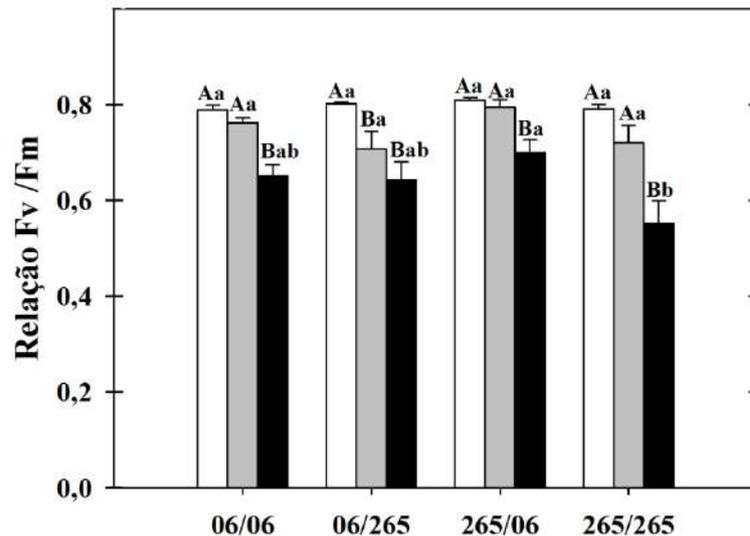


Figura 9. Eficiência quântica do fotossistema II (relação Fv/Fm) de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), irrigadas por 60 dias com água destilada (controle - □) e com água salina com condutividade elétrica de 2,0 (▒) e 4,0 (■) dS m^{-1} . Letras maiúsculas diferentes, dentro de cada combinação de enxertia, e letras minúsculas diferentes, no mesmo tratamento salino, representam diferenças significativas decorrentes do estresse salino e da combinação de enxerto/porta-enxerto, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão.

A fotossíntese é um dos principais processos fisiológicos afetados pela salinidade. Os efeitos negativos do estresse salino na fotossíntese podem ser decorrentes de fatores estomáticos e não estomáticos (FLEXAS *et al.*, 2004). Os fatores estomáticos incluem o decréscimo da disponibilidade de CO_2 , como resultado da limitação da difusão estomática e mesofílica. Dentre os mecanismos não estomáticos, destacam-se reduções no conteúdo total de clorofila, no transporte de elétrons nos cloroplastos e, conseqüentemente, decréscimos na eficiência da maquinaria fotossintética (ARAGÃO *et al.*, 2012; YAN *et al.*, 2012).

No presente estudo, observou-se que ambos os processos, estomáticos e não estomáticos, podem ter limitado as trocas gasosas das plantas de cajueiro anão precoce sob estresse salino (Figuras 7, 8 e 9). Vale ressaltar que os efeitos da salinidade foram menos severos nas plantas enxertadas BRS 265/CCP 06, ao passo que foram mais limitantes na combinação CCP 06/CCP 06. Adicionalmente, os efeitos decorrentes do estresse nos

parâmetros fotossintéticos foram refletidos em alterações no crescimento das plantas (Figuras 2, 3, 5 e 8).

4.3 Enzimas antioxidantes

A atividade das principais enzimas antioxidantes, em folhas e raízes de plantas enxertadas de cajueiro anão precoce (Figura 10). A atividade da SOD nas folhas não variou significativamente em função da salinidade, em todas as enxertias, à exceção da combinação CCP 06/BRS 265, na qual houve uma redução significativa dessa variável, nos tratamentos de 2,0 e 4,0 dS m⁻¹, em comparação ao controle. Ao se comparar as enxertias empregadas, observa-se que, na condição controle, a CCP 06/CCP 06 foi a que apresentou menor atividade da SOD, mas essa resposta não se manteve no tratamento a 4,0 dS m⁻¹, no qual houve nenhuma diferença significativa entre as combinações de enxertia (Figura 10A).

A atividade da SOD nas raízes foi bem distinta daquela observada nas folhas. Nesses órgãos e em todas as enxertias, houve uma redução significativa dessa variável com o aumento da salinidade, sendo isso mais evidente nas combinações CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265, as quais sofreram redução de 58,5 e 56,1%, respectivamente, no tratamento a 4,0 dS m⁻¹, em relação ao seu controle (Figura 10B). De modo peculiar, na combinação BRS 265/CCP 06, a redução da atividade da SOD pela salinidade, em relação ao controle, foi mais intensa a 2,0 dS m⁻¹ (63,1%), tendo havido um aumento de 69,5% nessa variável, no tratamento salino a 4,0 dS m⁻¹, em relação ao menor nível salino (Figura 10B). Entre as enxertias, vê-se que, na condição controle, os maiores valores de atividade da SOD foram observados nas combinações CCP 06/BRS 265 e BRS 265/CCP 06. No tratamento de 2,0 dS m⁻¹, por sua vez, não houve diferença significativa entre as combinações, no entanto, no tratamento a 4,0 dS m⁻¹, a combinação BRS 265/CCP 06 foi a que apresentou maior atividade da SOD (Figura 10B).

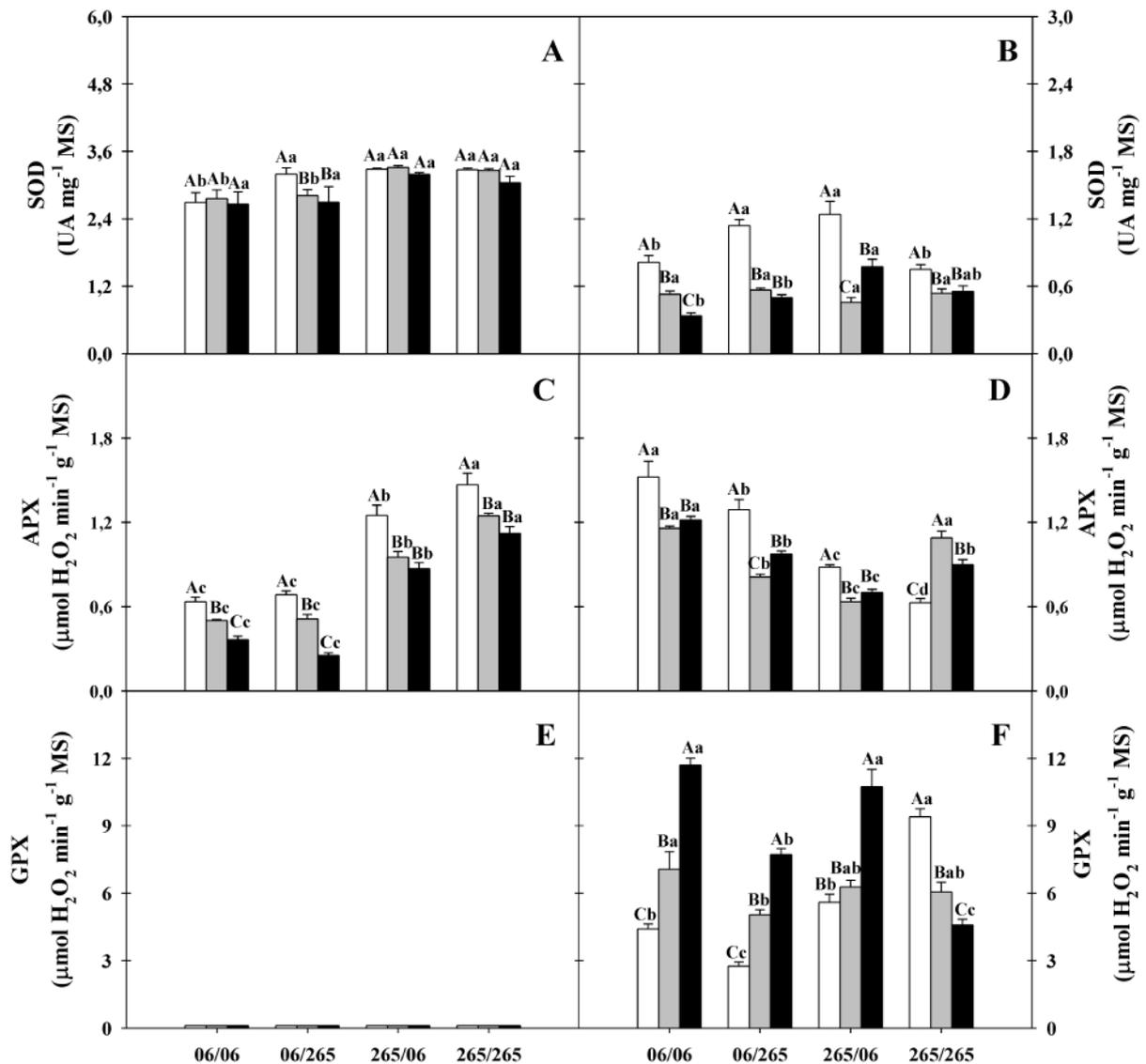


Figura 10. Atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (GPX) nas folhas (A, C, E) e nas raízes (B, D, F) de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), irrigadas por 60 dias com água destilada (controle - □) e com água salina com condutividade elétrica de 2,0 (■) e 4,0 (■) dS m⁻¹. Letras maiúsculas diferentes, dentro de cada combinação de enxertia, e letras minúsculas diferentes, no mesmo tratamento salino, representam diferenças significativas decorrentes do estresse salino e da combinação de enxerto/porta-enxerto, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão.

A SOD é uma enzima ubíqua em organismos aeróbicos e possui um papel-chave na defesa contra os danos causados pelas ROS, uma vez que sua atividade modula os níveis de superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, por conseguinte, diminui os riscos de formação do radical hidroxil (OH^\bullet) (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). Neste experimento, o estresse salino praticamente não afetou a atividade da SOD nas folhas e a

reduziu nas raízes. Em estudo anterior, a atividade da SOD também não foi influenciada pela salinidade (NaCl a até 200 mM), em folhas de cajueiro anão precoce (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2011). Ainda assim, nas raízes, as plantas BRS 265/CCP 06 tiveram um ligeiro aumento de atividade da SOD a 4,0 dS m⁻¹, em relação a 2,0 dS m⁻¹ (Figura 10B), e isso aumentou a ação removedora de •O₂⁻ nesse órgão, nas condições salinas.

A atividade da APX foi afetada significativamente, tanto pela salinidade, quanto pelas enxertias. Nas folhas, a salinidade reduziu gradativamente a atividade da APX, e as maiores reduções foram observadas nas combinações CCP 06/CCP 06 (42,5%) e CCP 06/BRS 265 (63,0%), no tratamento salino a 4,0 dS m⁻¹ (Figura 10C). Comparando-se as enxertias, pode-se observar que a combinação BRS 265/BRS 265 foi a que apresentou os maiores valores de atividade da APX nas folhas, em quaisquer dos tratamentos, seguida pela combinação BRS 265/CCP 06 (Figura 10C). Nas raízes, a atividade da APX foi reduzida pela salinidade em todas as combinações, exceto na BRS 265/BRS 265, na qual houve aumento da atividade quando as plantas estiveram sob estresse salino (Figura 10D). Em relação às enxertias, a CCP 06/CCP 06 foi a que teve os maiores valores de atividade da APX nas raízes, em todos os tratamentos, ao passo que a combinação BRS 265/CCP 06 apresentou os menores valores de atividade dessa enzima (Figura 10D).

Não se pôde determinar a atividade da GPX nas folhas das plantas de cajueiro anão precoce (Figura 10E). Nas raízes, por outro lado, a salinidade influenciou significativamente a atividade dessa enzima em todas as combinações (Figura 10F). À medida que a salinidade intensificou-se, a atividade da GPX nas raízes aumentou, alcançando valores 165,1; 181,3 e 91,8 % maiores que aqueles do controle, nas combinações CCP 06/CCP 06, CCP 06/BRS 265 e BRS 265/BRS 265, respectivamente. A combinação BRS 265/BRS 265 foi a única em que a salinidade reduziu a atividade da GPX, nas raízes. Dessa forma, na condição controle, a combinação que apresentou a maior atividade da GPX foi a BRS 265/BRS 265, enquanto a menor, foi a CCP 06/CCP 06. No tratamento salino a 2,0 dS m⁻¹, as variações entre as combinações de enxertia foram poucas ou inexistentes, mas já no tratamento salino a 4,0 dS m⁻¹, CCP 06/CCP 06 e BRS 265/CCP 06 foram as combinações que apresentaram maior atividade da GPX (Figura 10F).

O H₂O₂ gerado após a atividade da SOD ainda é tóxico e precisa ser eliminado pela conversão a H₂O em reações subsequentes, e as principais enzimas associadas a essa remoção são a catalase e as peroxidases. Entre as peroxidases estudadas, a GPX foi a que teve maior atividade removedora de H₂O₂ (Figura 10). Essa conclusão só pôde ser tirada com base nos valores nas raízes, já que não se conseguiu determinar a atividade da GPX nas folhas das

plantas de cajueiro anão precoce. Em todas as combinações, a atividade reduzida da APX nas folhas, em decorrência da salinidade, pode representar uma capacidade antioxidante limitada nesses órgãos, e essa resposta também tinha sido observada antes em cajueiro anão precoce (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2011). Nas raízes, de modo interessante, a redução na atividade da APX causada pela salinidade, nas combinações CCP 06/CCP 06, CCP 06/BRS 265 e BRS 265/CCP 06, foi contrabalançada por um aumento na atividade da GPX. Inversamente, a redução que houve na atividade da GPX, na combinação BRS 265/BRS 265, foi acompanhada por um aumento na atividade da APX. Tais mudanças parecem ter tido a finalidade de manter sempre elevada a taxa de remoção de H₂O₂ nesses órgãos, a despeito que qual enzima estivesse envolvida.

4.4 Homeostase iônica

A tolerância das plantas à salinidade varia amplamente entre as espécies (isto é, com o mecanismo específico que é utilizado para responder à salinidade), e depende de diversos fatores, tais como a concentração e do tempo de exposição aos sais, as condições ambientais e a interação entre estresses (PRISCO; GOMES-FILHO, 2010; SHINOZAKI *et al.*, 2015). Diversos autores têm destacado a manutenção da homeostase iônica como determinante para a tolerância de plantas ao estresse salino. Tais estudos mostram que o controle mais eficiente da absorção e alocação de K⁺ bem como o da exclusão e compartimentação de Na⁺ e Cl⁻ são mecanismos-chave para a regulação da homeostase iônica em plantas sob estresse.

Para investigar a influência da enxertia na modulação da homeostase iônica de plantas de cajueiro sob salinidade, os teores de K⁺, Na⁺ e Cl⁻ foram mensurados. Os teores de cloreto (Cl⁻) aumentaram com o incremento dos sais na água de irrigação, independente do órgão analisado e da combinação de enxertia (Figura 11). Em termos absolutos, sob condições de estresse salino, os maiores teores desse íon foram encontrados nas folhas, seguido das raízes e caules. Além disso, alterações significativas nos teores de Cl⁻ decorrentes do tratamento de enxertia foram detectadas apenas nas folhas das plantas expostas à salinidade de 4,0 dS m⁻¹, sendo os maiores valores registrados na combinação CCP 06/CCP 06.

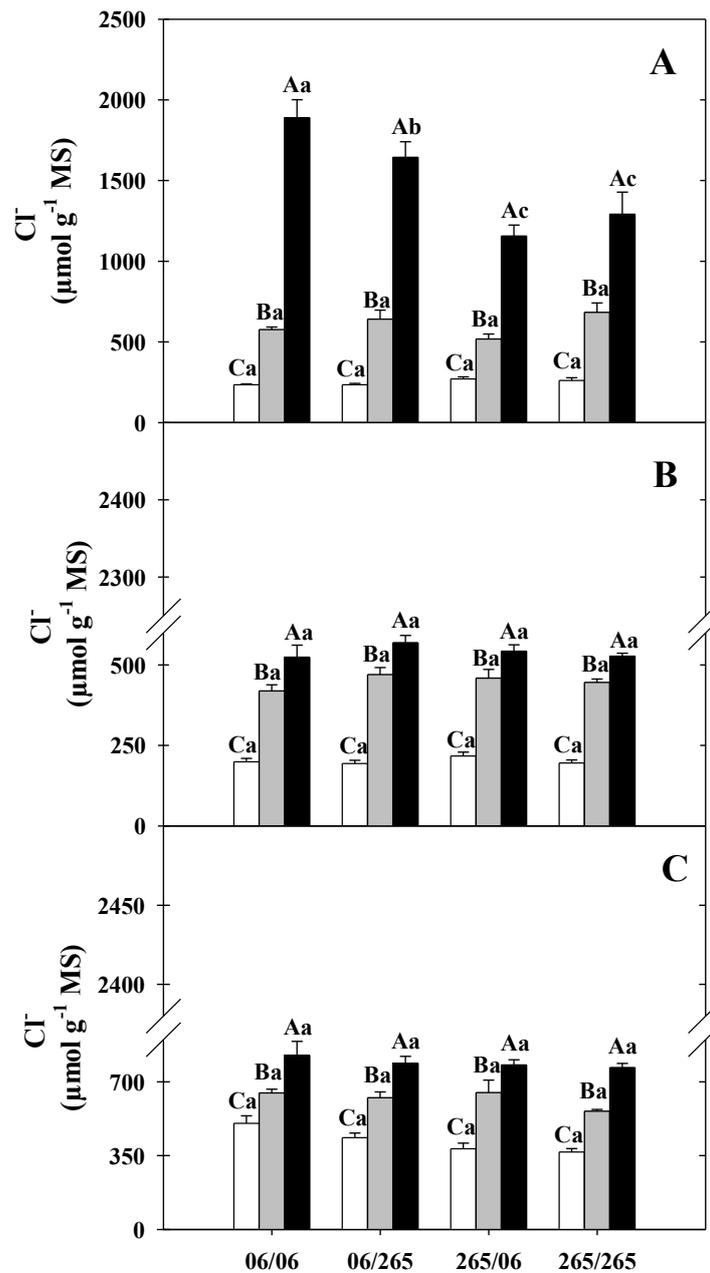


Figura 11. Teores de cloreto (Cl⁻) em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), irrigadas por 60 dias com água destilada (controle - □) e com água salina com condutividade elétrica de 2,0 (▒) e 4,0 (■) dS m⁻¹. Letras maiúsculas diferentes, dentro de cada combinação de enxertia, e letras minúsculas diferentes, no mesmo tratamento salino, representam diferenças significativas decorrentes do estresse salino e da combinação de enxerto/porta-enxerto, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão.

Nesse estudo, os teores de potássio (K⁺) apresentaram variações significativas em função de todos os tratamentos analisados, exceto nas folhas da combinação BRS 265/BRS 265 (Figura 12A, C, E). Neste órgão, plantas da combinação de enxertia BRS 265/CCP 06 foram as únicas a mostrar decréscimos significativos nos teores de K⁺ com a salinidade, tanto a 2,0 quanto a 4,0 dS m⁻¹ (Figura 12A). Surpreendentemente, as combinações CCP 06/CCP

06 e CCP 06/BRS 265 apresentaram incrementos de 35 e 84%, respectivamente, quando expostas à salinidade de 4,0 dS m⁻¹, em comparação aos controles. Em contraste, nos caules e raízes, plantas de todas as combinações de enxertia apresentaram reduções nos teores de K⁺, independente do estresse salino (Figura 12C e E).

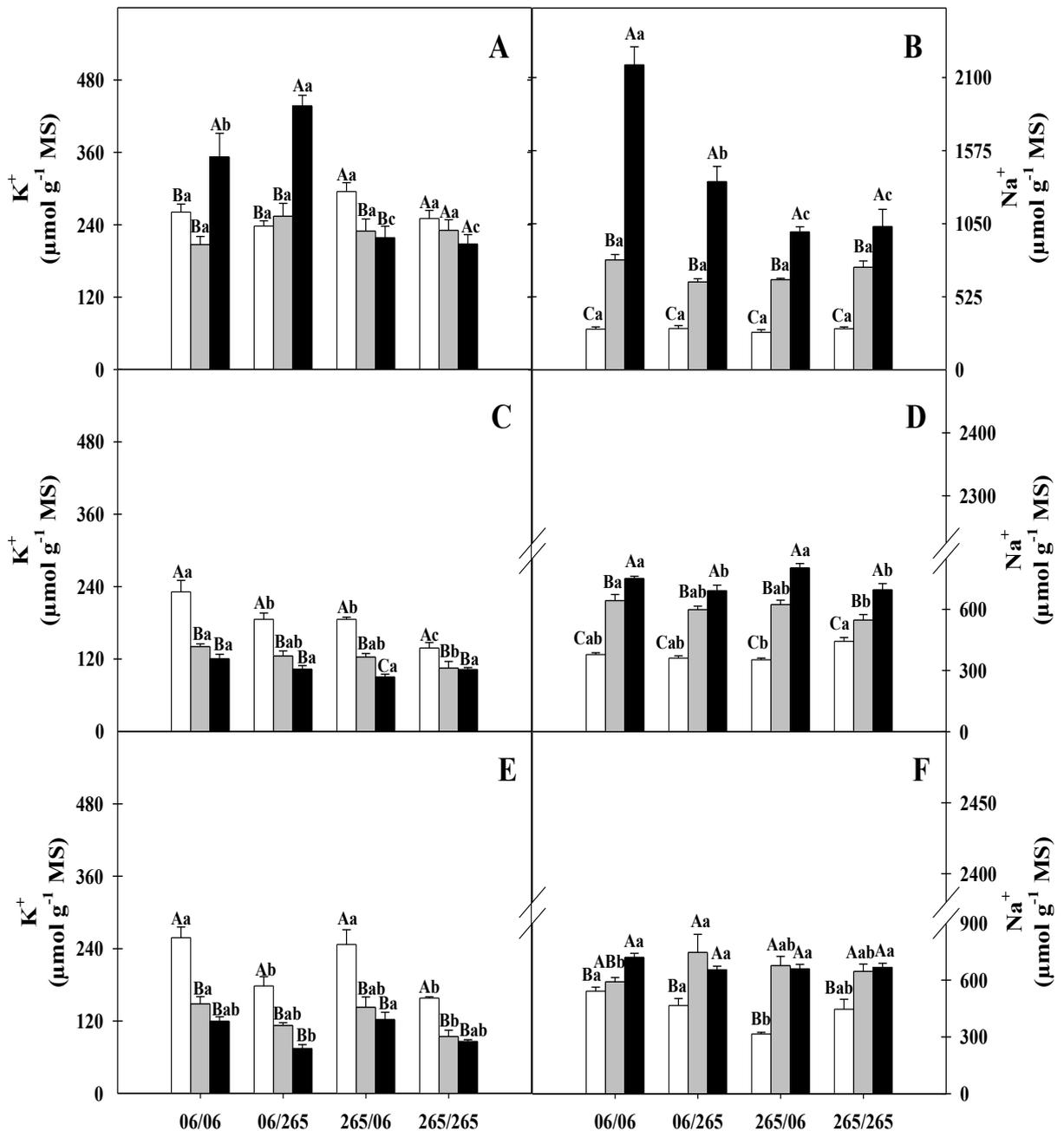


Figura 12. Teores de potássio (K⁺) e sódio (Na⁺) em folhas (A, B), caules (C, D) e raízes (E, F) de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), irrigadas por 60 dias com água destilada (controle - □) e com água salina com condutividade elétrica de 2,0 (■) e 4,0 (■) dS m⁻¹. Letras maiúsculas diferentes, dentro de cada combinação de enxertia, e letras minúsculas diferentes, no mesmo tratamento salino, representam diferenças significativas decorrentes do estresse salino e da combinação de enxerto/porta-enxerto, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão.

De modo geral, sob condições controle, os teores de sódio (Na^+) dos diferentes órgãos das plantas de cajueiro anão precoce apresentaram pouca alteração pelas combinações de enxertia (Figuras 12B, D, F). Sob estresse salino, os teores de Na^+ aumentaram em todos os órgãos analisados, independente do tipo de enxertia. Na salinidade de $2,0 \text{ dS m}^{-1}$, o tratamento de enxertia não exerceu efeito sobre os teores de Na^+ , com exceção dos caules das plantas CCP 06/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 e das raízes das combinações CCP 06/BRS 265 e CCP 06/CCP 06 (Figura 12D, F). Já a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, a combinação de enxertia teve efeito significativo sobre os teores de Na^+ nas folhas; enquanto que plantas das enxertias BRS 265/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e CCP 06/BRS 265 apresentaram aumentos de 248, 269 e 356%, respectivamente, plantas provenientes da enxertia CCP 06/CCP 06 apresentaram incrementos de 650%, em relação ao controle (Figura 12B). Além disso, os teores de Na^+ das folhas das plantas CCP 06/CCP 06 estressadas a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$ foram, em média, 95% superiores àqueles das plantas estressadas das demais combinações de enxertia.

Sob condições controle, a relação Na^+/K^+ foi pouco influenciada pela enxertia nas folhas, caules e raízes das plantas de cajueiro anão precoce, porém esta relação aumentou com o estresse salino (Figura 13). Nas folhas, as combinações de enxertia CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265 apresentaram incrementos similares na relação Na^+/K^+ a $2,0$ e $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, enquanto que as combinações BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 apresentaram aumentos com o incremento da condutividade elétrica da água de irrigação (Figura 13A). Nos caules, a relação Na^+/K^+ aumentou fortemente com o estresse salino, sendo os maiores incrementos registrados nas plantas BRS 265/CCP 06 a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, com valores 350% maiores que os do controle (Figura 13B). Por outro lado, os menores incrementos na relação Na^+/K^+ das raízes, com o estresse salino ($4,0 \text{ dS m}^{-1}$), foram observados nas plantas dessa mesma combinação (BRS 265/CCP 06), sugerindo uma compartimentação preferencial de Na^+ nos caules em relação aos demais órgãos (Figura 13C).

No estudo de Craig Plett e Møller (2010), a interação entre potássio (K^+) e sódio (Na^+) é discutida como um mecanismo crucial para a tolerância ao estresse salino em glicófitas. Os autores destacam que, em ambientes salinos, a manutenção de altos níveis de K^+ , associada a baixas concentrações de Na^+ , permite que as plantas preservem suas funções fisiológicas essenciais, como a fotossíntese e a absorção de água. Essa relação é fundamental, pois o Na^+ , em excesso, pode competir com o K^+ , prejudicando a homeostase iônica e a atividade enzimática. No entanto, é importante ressaltar que a tolerância à salinidade em glicófitas não

se baseia apenas nesse mecanismo isolado. Outras estratégias, como o ajuste osmótico através da síntese de compostos orgânicos, a regulação hormonal e a ativação de vias de sinalização celular, também desempenham papéis significativos (CRAIG PLETT; MØLLER, 2010). Para minimizar o acúmulo de Na^+ nos tecidos, as plantas podem: diminuir o carregamento de sais no xilema ou intensificar sua retirada antes de chegar à parte aérea; aumentar a recirculação dos sais da parte aérea via floema; aumentar a compartimentação ou a alocação dos sais para locais particulares da parte aérea (como as folhas mais velhas); ou excretar os sais para a superfície das folhas (somente halófitas) (MUNNS; TESTER, 2008).

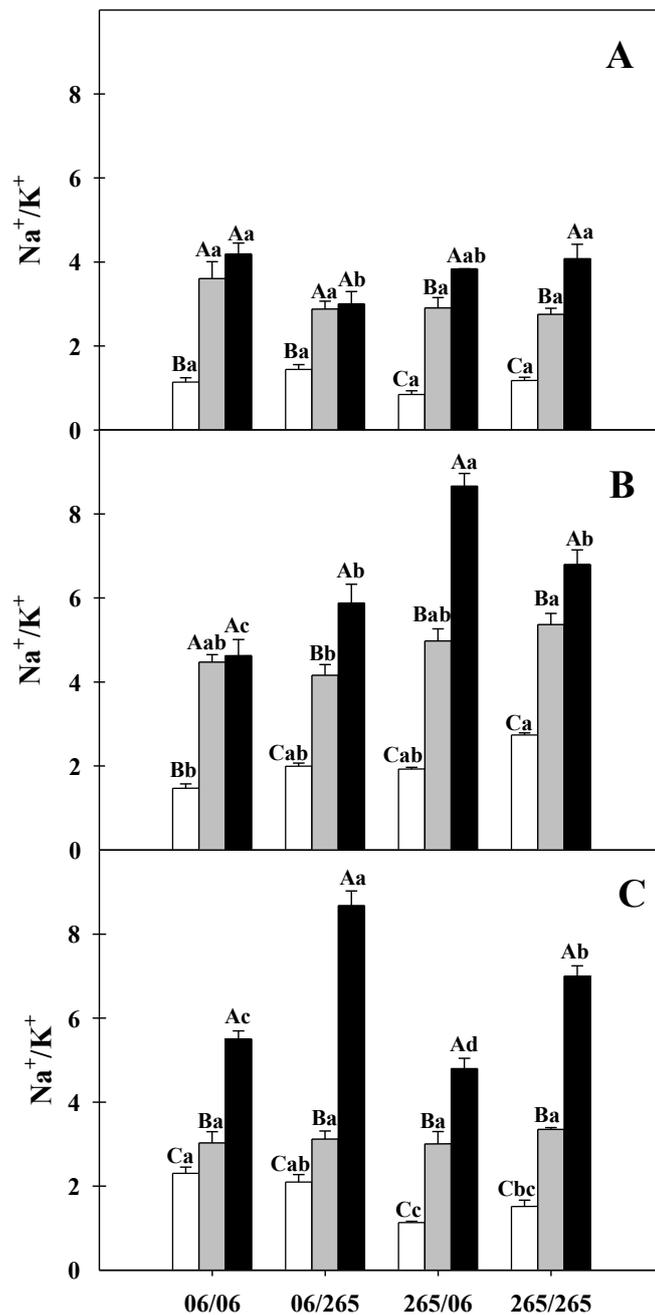


Figura 13. Relação Na^+/K^+ em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), irrigadas por 60 dias com água destilada (controle - □) e com água salina com condutividade elétrica de 2,0 (■) e 4,0 (■) dS m^{-1} . Letras maiúsculas diferentes, dentro de cada combinação de enxertia, e letras minúsculas diferentes, no mesmo tratamento salino, representam diferenças significativas decorrentes do estresse salino e da combinação de enxerto/porta-enxerto, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão.

4.5 Solutos orgânicos

A Figura 14 apresenta os teores de carboidratos solúveis em folhas, caules e raízes de mudas enxertadas de cajueiro anão precoce. Nas folhas, a salinidade afetou os teores de carboidratos solúveis apenas na combinação CCP 06/CCP 06, na qual eles reduziram em até 38,1% ($4,0 \text{ dS m}^{-1}$), e na CCP 06/BRS 265, em que eles aumentaram, em média 14,0%, nos tratamentos salinos (Figura 14A). Os teores caulinares de carboidratos decresceram com a salinidade, especialmente a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, em todas as enxertias, e essa redução foi mais evidente nas combinações BRS 265/CCP 06 (38,2%) e BRS 265/BRS 265 (32,9%) (Figura 14B). Nas raízes, o órgão que apresentou os menores teores de carboidratos, a principal variação ocorreu na combinação CCP 06/CCP 06, em que a salinidade reduziu-os em 36,3%, em média, em relação ao controle, enquanto que, nas demais, houve pouca ou nenhuma variação significativa, em razão da salinidade (Figura 12C).

Vários autores relacionam mudanças nos teores de carboidratos com adaptação à salinidade, sugerindo um papel significativo deles na tolerância das plantas a esse estresse, em razão da sua relação direta com alguns processos fisiológicos, tais como fotossíntese, translocação e respiração (KEREPESI; GALIBA, 2000; JAMIL *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015). Além da contribuição dos carboidratos solúveis no ajustamento osmótico, eles também podem estar envolvidos na osmoproteção e na remoção de espécies reativas de oxigênio (PARIDA; DAS, 2005). Por outro lado, o acúmulo de solutos frente à salinidade e a outros estresses abióticos pode dar-se simplesmente porque o suprimento de assimilados pelas folhas excede sua demanda nos tecidos em crescimento (MUNNS, 2005). Neste experimento, considerando os três órgãos estudados, a combinação CCP 06/CCP 06 foi a que menos acumulou carboidratos solúveis, ao passo que as plantas BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 foram as que mais acumularam esses osmólitos (Figura 14A).

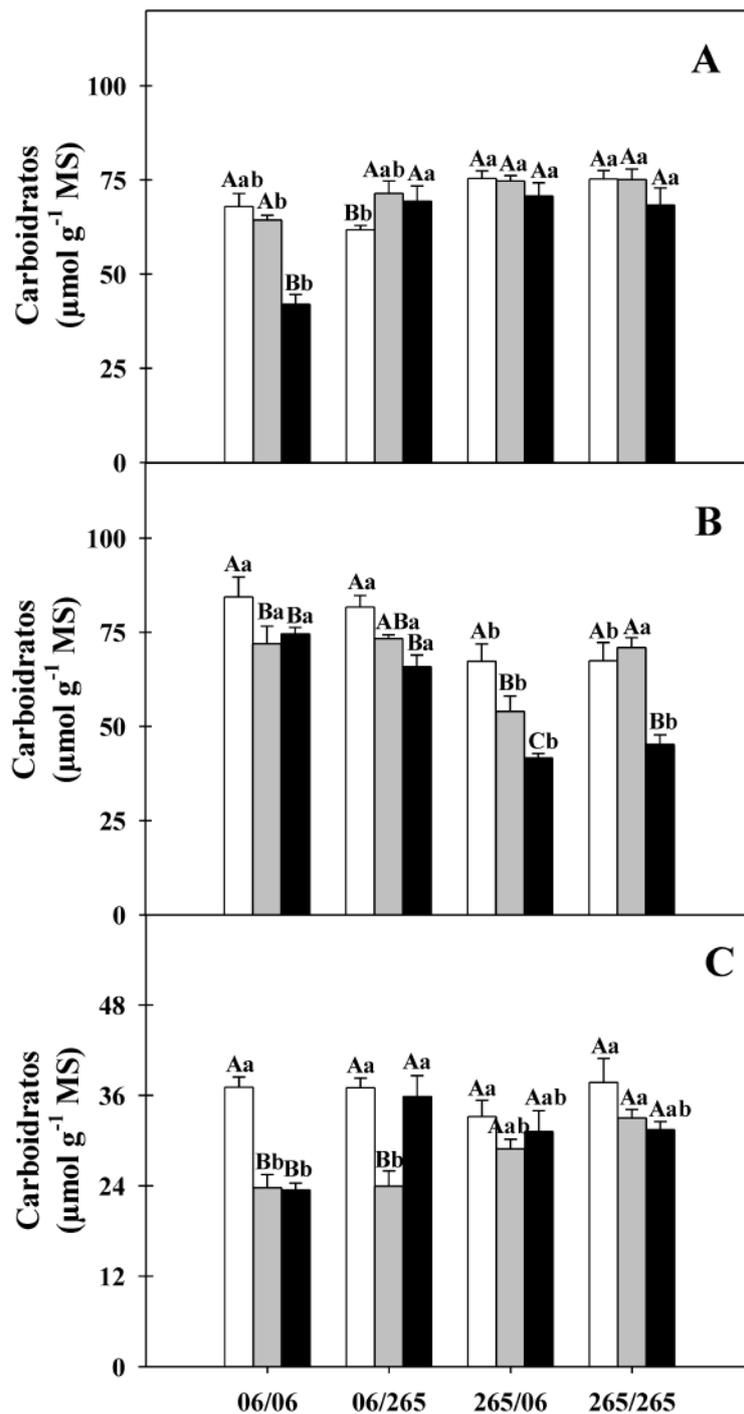


Figura 14. Teores de carboidratos solúveis em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), irrigadas por 60 dias com água destilada (controle - □) e com água salina com condutividade elétrica de 2,0 (■) e 4,0 (■) dS m⁻¹. Letras maiúsculas diferentes, dentro de cada combinação de enxertia, e letras minúsculas diferentes, no mesmo tratamento salino, representam diferenças significativas decorrentes do estresse salino e da combinação de enxerto/porta-enxerto, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão.

Os teores de prolina aumentaram fortemente com a salinidade, nas folhas das plantas de cajueiro anão precoce. Os maiores valores desse soluto foram observados a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, e as combinações CCP 06/CCP 06, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 foram as que acumularam mais prolina, em comparação aos respectivos controles (aumento médio de 653%) (Figura 15A). Nos caules, houve resposta similar, tendo os teores de prolina aumentado em todas as combinações, frente à salinidade, mas em uma menor proporção que nas folhas. Ainda, as combinações CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265 acumularam menos prolina nos caules que as restantes, quando sob a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$ (Figura 15B). Por fim, nas raízes, o efeito da salinidade nos teores de prolina variou de acordo com a enxertia. Nas combinações, CCP 06/CCP 06 e BRS 265/BRS 265, houve aumento gradual nos teores desse soluto, em função da salinidade, enquanto que, nas demais plantas, os teores de prolina ou diminuíram com a salinidade (CCP 06/BRS 265) ou permaneceram inalterados (BRS 265/CCP 06) (Figura 15C).

O acúmulo de prolina livre é uma resposta comum das plantas ao estresse salino (DEMIRAL; TÜRKAN, 2005), e isso ficou evidente nas folhas das plantas de cajueiro anão precoce (Figura 15A). Esse aumento nos teores de prolina já foi relatado por diversos autores, em diferentes espécies (LACERDA *et al.*, 2005; ABREU *et al.*, 2008; FERREIRA-SILVA, 2009), e ele pode ser decorrente tanto de um aumento na atividade das enzimas envolvidas na síntese desse osmólito, quanto da inibição daquelas envolvidas em sua oxidação (ASHRAF; FOOLAD, 2007). De modo geral, as plantas BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 foram as que acumularam mais prolina (Figura 15), o que pode ter contribuído para seu melhor desempenho frente à salinidade. Contudo, o papel osmorregulador da prolina nas plantas de cajueiro anão precoce é questionável, tendo em vista a baixa concentração que esse soluto geralmente alcança. Assim, é possível que a prolina neste caso esteja mais envolvida com a osmoproteção, contribuindo para a estabilidade da membrana celular e de macromoléculas (PARIDA; DAS, 2005).

Os teores foliares e caulinares de N-aminossolúveis, assim como os de prolina, aumentaram significativamente com a salinidade. Em ambos os órgãos, houve maior acúmulo desse soluto nas combinações CCP 06/BRS 265 e BRS 265/BRS 265, alcançando valores 209% e 225% superiores, respectivamente, nas folhas, e 84,9% e 71,8% superiores, respectivamente, nos caules, que os seus controles (Figuras 16A e B). Nas raízes, houve redução dos teores de N-aminossolúveis nas plantas CCP 06/BRS 265 e BRS 265/BRS 265, em função da salinidade, enquanto que, nas demais combinações, os teores desses solutos aumentaram gradualmente, especialmente a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$ (Figura 16C).

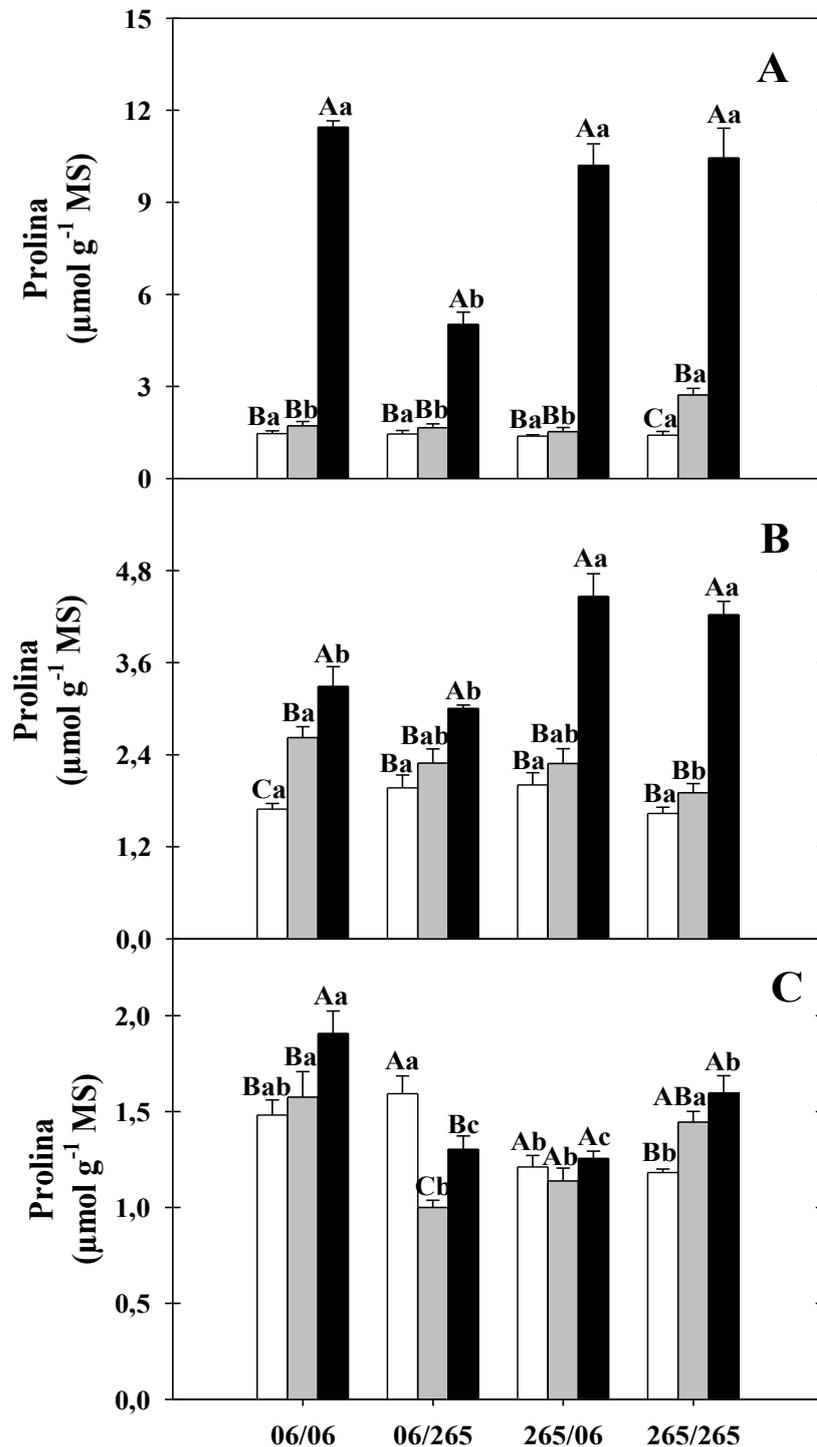


Figura 15. Teores de prolina em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), irrigadas por 60 dias com água destilada (controle - □) e com água salina com condutividade elétrica de 2,0 (■) e 4,0 (■) dS m⁻¹. Letras maiúsculas diferentes, dentro de cada combinação de enxertia, e letras minúsculas diferentes, no mesmo tratamento salino, representam diferenças significativas decorrentes do estresse salino e da combinação de enxerto/porta-enxerto, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão.

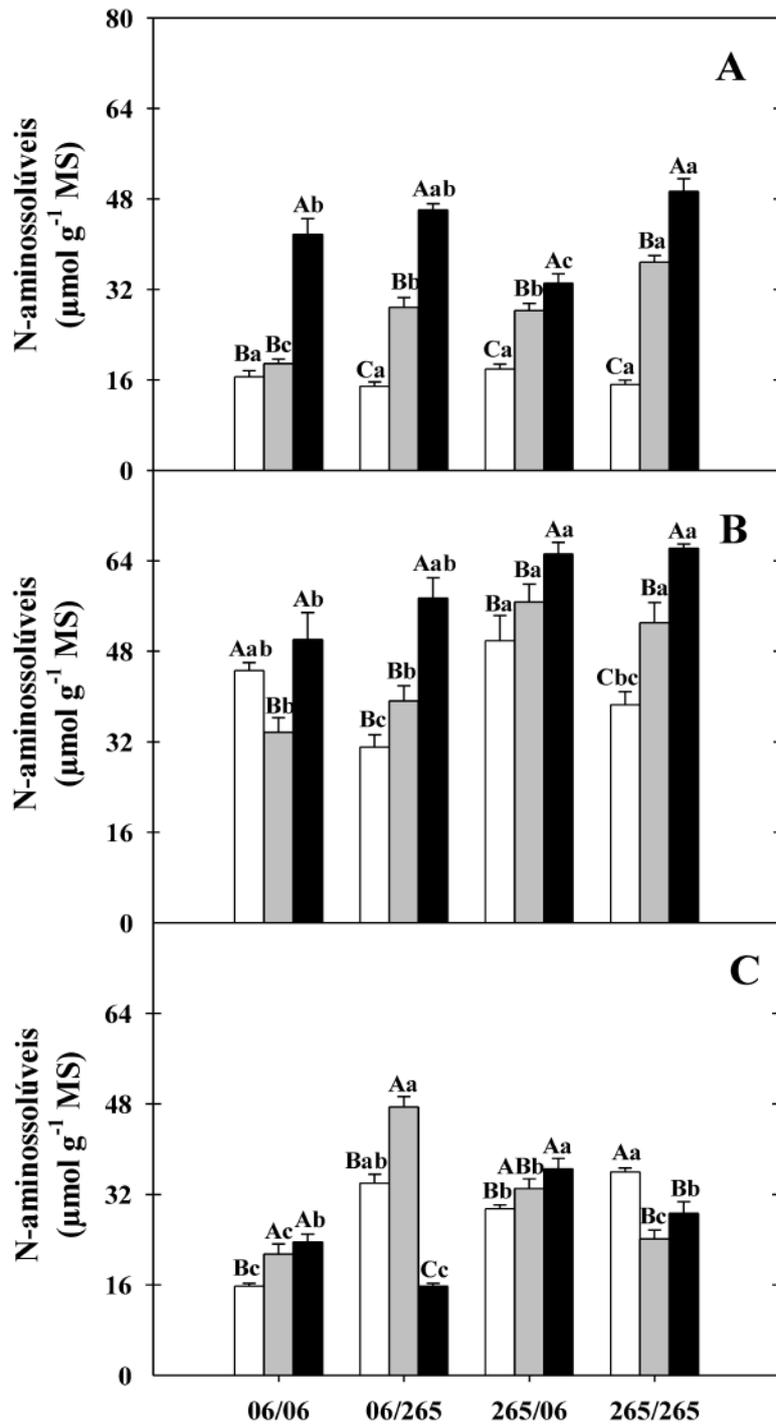


Figura 16. Teores de N-aminosolúveis em folhas (A), caules (B) e raízes (C) de plantas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto de dois clones de cajueiro anão precoce (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), irrigadas por 60 dias com água destilada (controle - □) e com água salina com condutividade elétrica de 2,0 (■) e 4,0 (■) dS m⁻¹. Letras maiúsculas diferentes, dentro de cada combinação de enxertia, e letras minúsculas diferentes, no mesmo tratamento salino, representam diferenças significativas decorrentes do estresse salino e da combinação de enxerto/porta-enxerto, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão.

Uma grande variedade de compostos nitrogenados solúveis e de baixo peso molecular pode ser encontrada em plantas expostas à salinidade. Os mais frequentes são os aminoácidos, os iminoácidos, os compostos de amônio quaternário e as poliaminas (PARIDA; DAS, 2005). Aqui, as plantas CCP 06/BRS 265 e BRS 265/BRS 265 acumularam mais N-aminossolúveis nas folhas e nos caules, porém foram as que tiveram menores teores desses solutos nas raízes, em condições salinas (Figura 16). Por outro lado, nas plantas BRS 265/CCP 06, os teores de N-aminossolúveis foram elevados nos três órgãos, mesmo na maior salinidade empregada (Figura 16), o que denota a maior capacidade de esses solutos terem contribuído para o ajustamento osmótico e exercido funções osmoprotetoras, nessas plantas.

4.6 Padrões proteicos bidimensionais

Géis eletroforéticos bidimensionais (2D) foram produzidos para verificar os efeitos da salinidade no padrão de proteínas expressas nas folhas de plantas enxertadas de cajueiro anão precoce. O experimento foi conduzido com plantas de cajueiro em diferentes combinações de enxerto/porta-enxerto, respectivamente (CCP 06/CCP 06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265) e sob condições de cultivo com águas de diferentes condutividades elétricas (CEa) [0,0 (controle); 2,0 e 4,0 dS m⁻¹]. A análise do proteoma diferencial foi realizada em folhas de cajueiro a partir de uma mistura composta das cinco repetições de cada tratamento, sendo utilizado o mesmo material empregado para a caracterização fisiológica e bioquímica nos tópicos iniciais desse trabalho (itens 4.1 a 4.5).

A comparação entre os controles e os tratamentos em experimentos de proteômica é crucial para garantir que as mudanças observadas na expressão proteica sejam de fato resultado das condições experimentais aplicadas, e não decorrentes de variações biológicas ou técnicas. No contexto de estudos envolvendo proteínas, essa comparação tem a função central de isolar os efeitos específicos do tratamento em questão, como o estresse salino, de outras variáveis que possam interferir no resultado, como condições ambientais ou endógenas do organismo em análise (SHEN *et al.*, 2002).

O controle funciona como ponto de referência, refletindo o estado basal ou "normal" das proteínas nas condições experimentais. Essa referência é essencial para identificar proteínas diferencialmente expressas em resposta ao tratamento. Ao comparar o grupo controle com os grupos tratados, é possível destacar quais proteínas estão se adaptando, sendo suprimidas ou induzidas em função do estresse imposto. Isso é particularmente importante em estudos de estresse abiótico, como a salinidade, que altera a expressão de proteínas de forma

ampla e complexa, exigindo uma referência clara para diferenciar respostas adaptativas das que ocorrem de maneira natural.

Além disso, a comparação com o controle minimiza a variabilidade técnica e biológica que pode surgir durante o processo experimental. Técnicas de alta sensibilidade, como a eletroforese bidimensional (2-DE) e a espectrometria de massas, podem ser influenciadas por pequenos fatores, como variações na preparação de amostras ou condições de execução dos ensaios (RABILLOUD, 1997). A utilização do controle ajuda a assegurar que as diferenças observadas nos spots proteicos refletem, de fato, as respostas ao tratamento aplicado, e não problemas técnicos no decorrer do processo.

Outro ponto importante é a comparação entre diferentes níveis de tratamento salino. Ao comparar o controle com os tratamentos salinos, como $CE=2,0$ e $CE=4,0$ $dS\ m^{-1}$, é possível observar como o aumento progressivo do estresse salino afeta a expressão proteica de maneira distinta. Essa abordagem é essencial em plantas, que desenvolvem diferentes mecanismos de adaptação à salinidade, como ajuste osmótico e proteção de proteínas e membranas, dependendo da intensidade do estresse (MUNNS; TESTER, 2008). A comparação sistemática revela quais proteínas estão envolvidas nessas respostas adaptativas e permite mapear como essas vias metabólicas são ativadas ou reprimidas em cada nível de tratamento.

Por fim, essa comparação é indispensável para validar os resultados e identificar proteínas que aparecem, desaparecem ou sofrem variações significativas em volume em resposta ao tratamento. Proteínas que surgem exclusivamente após o estresse ou que têm sua expressão alterada drasticamente podem indicar mecanismos chave de adaptação ou resposta ao estresse, como revelado em análises anteriores (NEUHOFF *et al.*, 1988). Dessa forma, a comparação com o controle é um passo crítico para garantir a robustez dos resultados e a identificação das proteínas diferencialmente expressas com relevância biológica.

As amostras de proteínas totais extraídas das folhas de cajueiro foram separadas na primeira dimensão pelo ponto isoelétrico, em gradiente de pH imobilizado linear, na faixa de 4 a 7 e, posteriormente, na segunda dimensão, a separação foi por peso molecular, através de eletroforese em condições desnaturantes. Inicialmente, as análises nos géis eletroforéticos 2D, feitas no programa ImageMaster 2D Platinum, foram realizadas comparando as diferentes combinações de enxerto/porta-enxerto dentro de um mesmo tratamento (controle e $4,0\ dS\ m^{-1}$). Posteriormente, foram realizadas comparações entre os níveis de sais em cada uma das combinações de enxertia. Estas análises mostraram grande reprodutibilidade dos resultados,

havendo grandes semelhanças entre os géis de um mesmo tratamento em combinações de enxertia diferentes.

4.6.1 Proteoma diferencial de folhas de combinações de enxerto/porta-enxerto de cajueiro anão precoce em ausência de salinidade

Os resultados das eletroforeses 2D das combinações de enxertia CCP 06/CCP 06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 apresentaram, em média, um total de 627, 582, 560 e 611 *spots* proteicos, respectivamente, nas plantas sob condições controle. Na figura 17 são apresentados os géis 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce das combinações CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265. Entre os *spots* detectados, 472 foram comparados entre si, sendo identificada diferença na expressão de 14 *spots*. Quando se compara o padrão de expressão proteica da segunda combinação de enxertia com o da primeira, observam-se que quatro proteínas (*spots* 97, 177, 202 e 280) tiveram aumento de intensidade e 10 (*spots* 2, 17, 20, 23, 51, 78, 192, 197, 204 e 337) tiveram sua expressão reduzida (Figura 17).

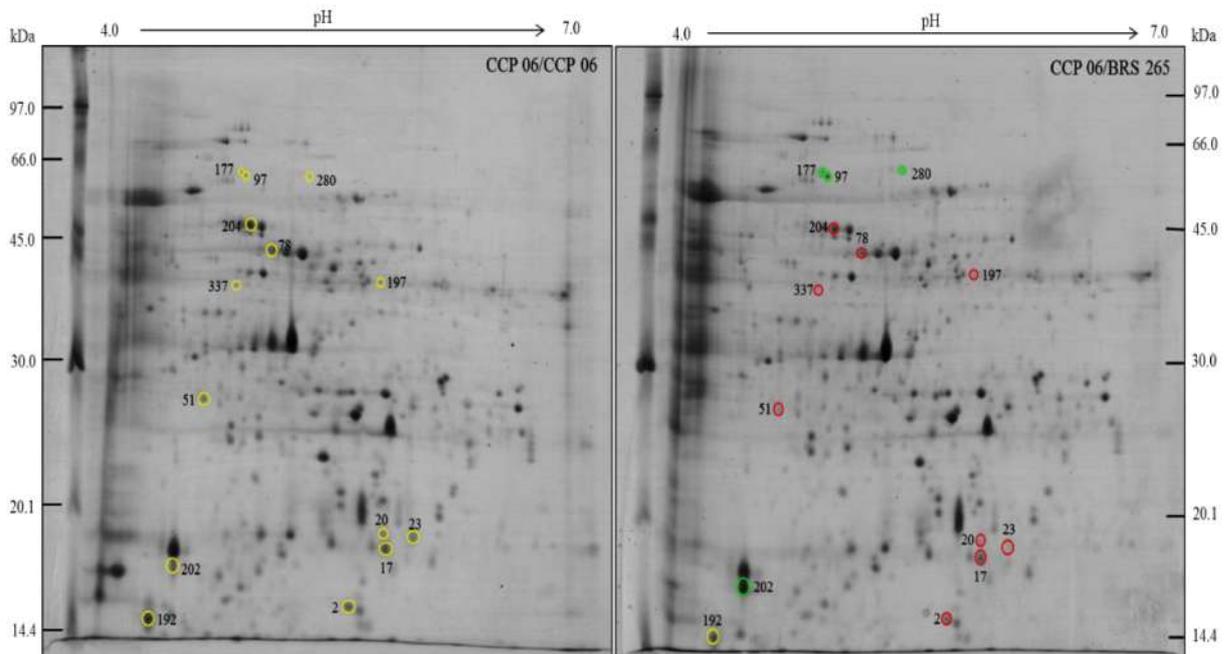


Figura 17. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinações enxerto/porta-enxerto CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265, cultivadas por 60 dias sob condições controle (água destilada). Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes na combinação CCP 06/CCP 06 que tiveram expressão proteica diferencial em relação à CCP 06/BRS 265. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. Para cada gel, aplicaram-se 0,5 mg de proteína, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

Na comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas das enxertias CCP 06/CCP 06 e BRS 265/CCP 06 houve uma correspondência entre 433 *spots* proteicos, sendo que 24 *spots* proteicos apresentaram intensidade aumentada (*spots* 5, 15, 19, 22, 33, 38, 40, 57, 97, 102, 103, 119, 124, 177, 193, 226, 227, 274, 280, 314, 319, 321, 323 e 331) e 26 apresentaram redução (*spots* 7, 10, 44, 45, 59, 68, 73, 77, 78, 84, 85, 109, 129, 171, 172, 174, 175, 181, 192, 195, 224, 313, 322, 327, 328 e 348), quando se considera a segunda combinação de enxertia em relação à primeira (Figura 18). Além disso, 22 proteínas (*spots* 1, 2, 6, 9, 116, 122, 139, 169, 180, 202, 205, 312, 215, 315, 316, 317, 320, 324, 325, 326, 335 e 337) foram expressas apenas na combinação CCP 06/CCP 06 e 10 (*spots* 8, 24, 133, 135, 154, 167, 290, 318, 329 e 330) foram encontradas exclusivamente na combinação de enxertia BRS 265/CCP 06.

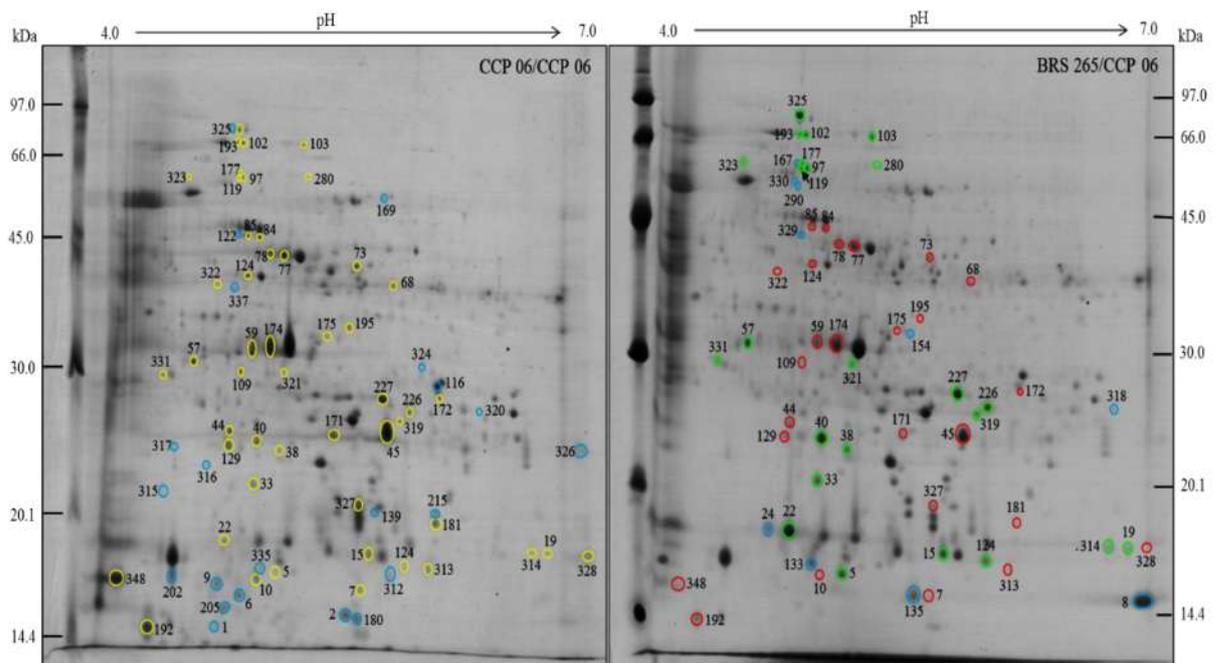


Figura 18. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinações enxerto/porta-enxerto CCP 06/CCP 06 e BRS 265/CCP 06, cultivadas por 60 dias sob condições controle (água destilada). Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes na combinação CCP 06/CCP 06 que tiveram expressão proteica diferencial em relação à BRS 265/CCP 06. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se 0,5 mg de proteína, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

Na figura 19 é mostrada a comparação entre os padrões eletroforéticos 2D das folhas de plantas das combinações de enxertia CCP 06/CCP 06 e BRS 265/BRS 265, sob condições controle, sendo avaliados 470 *spots* correspondentes. Desses, foram observadas diferença no perfil proteico de 47 proteínas (polipeptídeos). Nessa comparação, foram observados aumentos na expressão de 16 *spots* proteicos (5, 15, 22, 33, 34, 35, 38, 40, 97, 102, 163, 177,

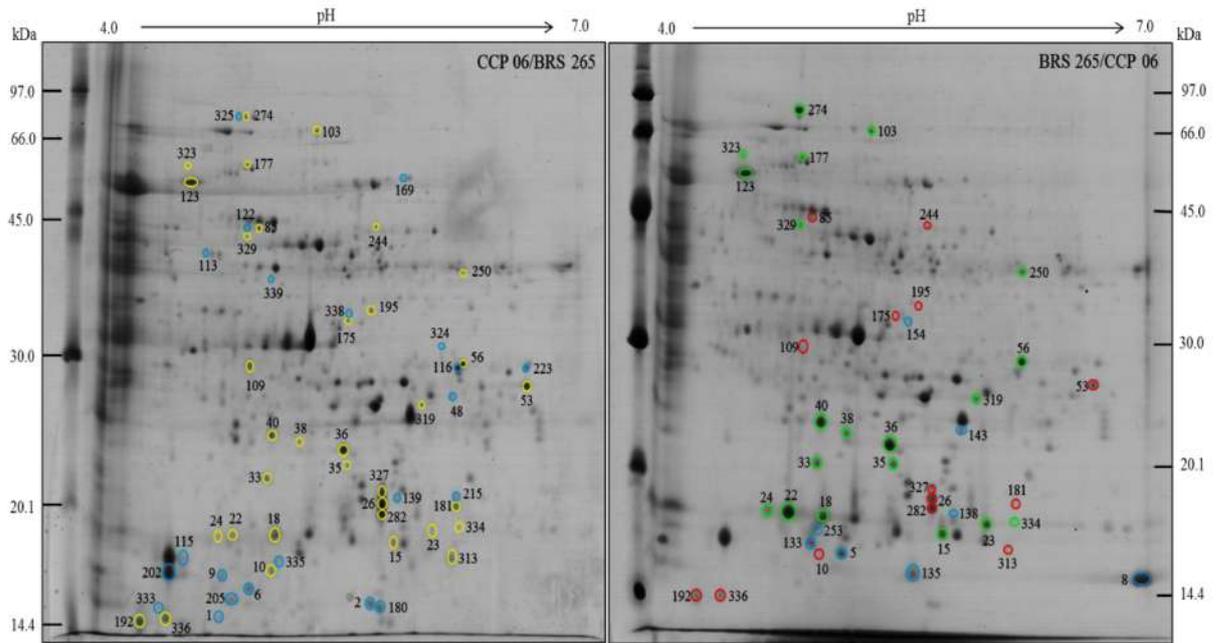


Figura 20. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinações enxerto/porta-enxerto CCP 06/BRS 265 e BRS 265/CCP 06, cultivadas por 60 dias sob condições controle (água destilada). Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes na CCP 06/BRS 265 que tiveram expressão proteica diferencial em relação à BRS 265/CCP 06. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se 0,5 mg de proteína, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

Nos géis proteicos das plantas CCP 06/BRS 265 e BRS 265/BRS 265, sob condições controle, foram comparados 443 *spots*; destes, um total de 46 tiveram expressão proteica diferencial, sendo observados incrementos na expressão em 24 polipeptídeos (*spots* 15, 16, 22, 23, 24, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 40, 56, 63, 64, 163, 177, 196, 204, 220, 222, 274, 314 e 342) e decréscimos na expressão de sete (*spots* 48, 109, 129, 175, 202, 244 e 340), quando se compara a enxertia BRS 265/BRS 265 em relação à enxertia CCP 06/BRS 265 (Figura 21). Observou-se, também, a presença de cinco *spots* apenas na combinação de enxertia CCP 06/BRS 265 (116, 169, 223, 324 e 325) e 10 *spots* somente na enxertia BRS 265/BRS 265 (5, 8, 133, 135, 138, 141, 253, 318, 341 e 346).

Na comparação dos géis 2D das enxertias BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265, 418 *spots* foram analisados, sendo observadas diferenças na expressão proteica de 45 deles. Comparando o padrão proteico foliar das plantas da segunda enxertia com o da primeira, houve aumento na expressão de 18 proteínas (*spots* 7, 10, 26, 34, 63, 64, 77, 78, 181, 171, 192, 195, 196, 216, 222, 229, 313 e 327) e redução em seis (*spots* 43, 103, 123, 227, 271 e 272) (Figura 22). Além disso, apenas uma proteína foi detectada somente na combinação BRS 265/CCP 06 (*spots* 237) e 20 proteínas estavam presentes somente na combinação BRS

265/BRS 265 (*spots* 1, 2, 9, 115, 139, 141, 180, 202, 205, 215, 230, 232, 295, 312, 316, 333, 343, 344, 345 e 347).

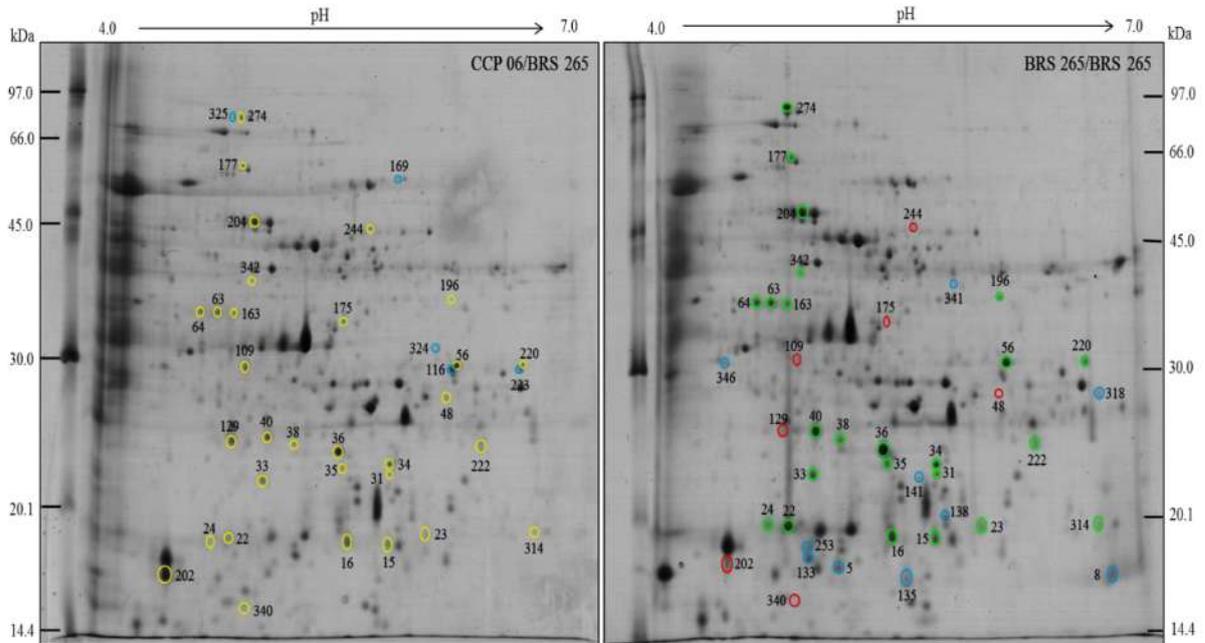


Figura 21. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinações enxerto/porta-enxerto CCP 06/BRS 265 e BRS 265/BRS 265, cultivadas por 60 dias sob condições controle (água destilada). Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes na CCP 06/BRS 265 que tiveram expressão proteica diferencial em relação à BRS 265/BRS 265. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se 0,5 mg de proteína, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

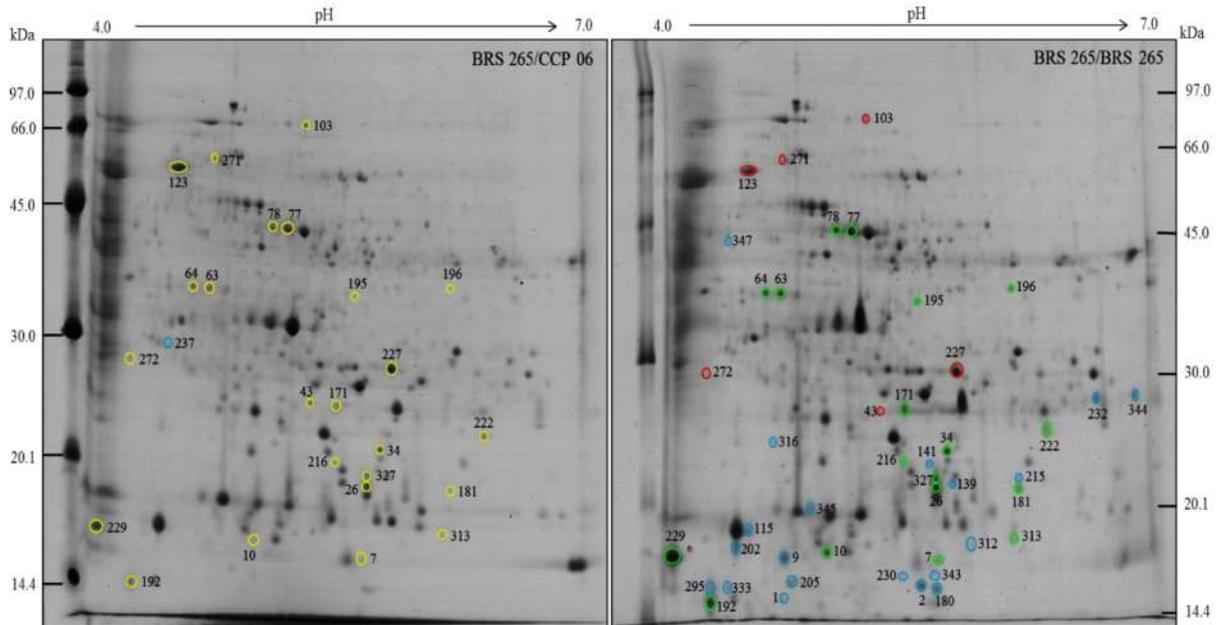


Figura 22. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinações enxerto/porta-enxerto BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265, cultivadas por 60 dias sob condições controle (água destilada). Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes na BRS 265/CCP 06 que tiveram expressão proteica diferencial em relação à BRS 265/BRS 265. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se 0,5 mg de proteína, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

4.6.2 Proteoma diferencial de folhas de combinações de enxerto/porta-enxerto de cajueiro anão precoce sob estresse salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$

Os resultados das eletroforeses 2D das combinações de enxertia CCP 06/CCP 06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 revelaram, em média, respectivamente, os totais de 544, 489, 862 e 724 *spots* nos padrões proteicos foliares das plantas enxertadas de cajueiro anão precoce, sob condições de estresse salino ($4,0 \text{ dS m}^{-1}$). Nos géis proteicos das plantas enxertadas CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265 foram comparados 411 *spots* proteicos. Destes, um total de 22 tiveram expressão proteica diferencial, sendo observados incrementos na expressão de seis polipeptídeos (*spots* 15, 73, 92, 94, 97 e 119) e decréscimos na expressão em onze (*spots* 12, 18, 21, 35, 51, 61, 87, 105, 110, 111, 112 e 119), quando se compara o padrão de expressão proteica da enxertia CCP 06/BRS 265, em relação àquela da enxertia CCP 06/CCP 06 (Figura 23). Observou-se, também, que cinco *spots* somente estavam presentes na enxertia CCP 06/CCP 06 (*spots* 62, 63, 84, 85 e 107).

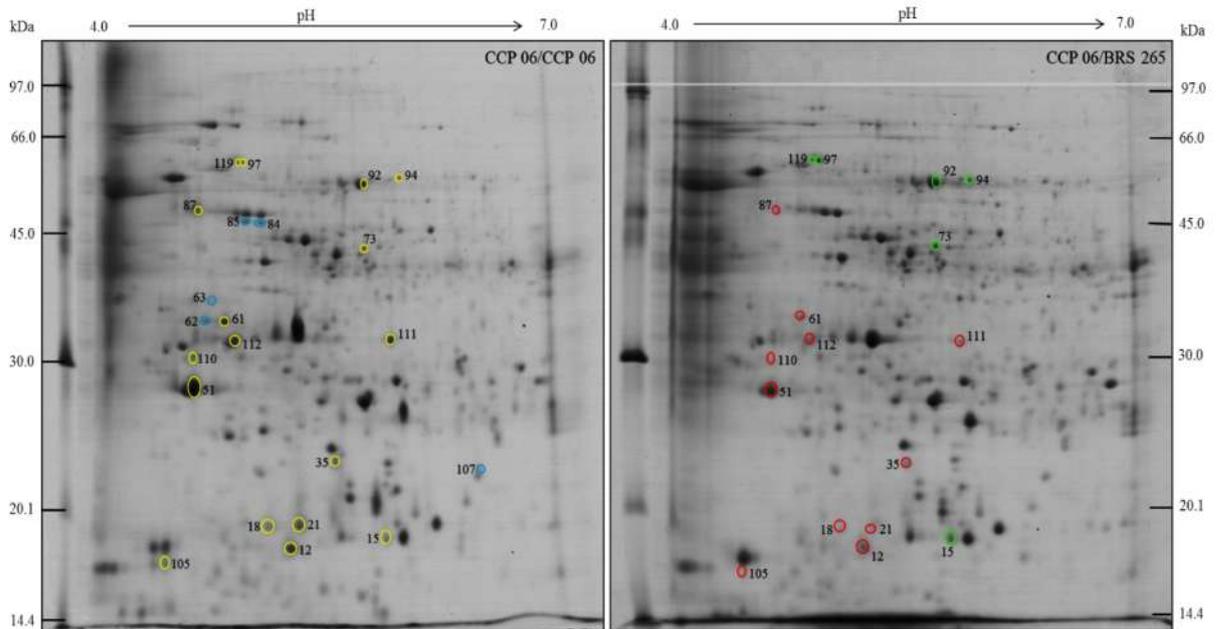


Figura 23. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinações enxerto/porta-enxerto CCP 06/CCP 06 e CCP 06/BRS 265, cultivadas por 60 dias sob condições de estresse salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes na CCP 06/CCP 06 que tiveram expressão proteica diferencial em relação à CCP 06/BRS 265. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se $0,5 \text{ mg}$ de proteína, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

A comparação entre os géis 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce das combinações de enxertias CCP 06/CCP 06 e BRS 265/CCP 06, cultivadas a uma CEa de $4,0 \text{ dS m}^{-1}$ está apresentada na Figura 24. Entre os *spots* proteicos detectados nessas duas combinações, 468 foram comparados, sendo identificada diferença na expressão de 99 *spots*, sendo que 26 proteínas tiveram aumento de intensidade (*spots* 7, 8, 9, 10, 18, 21, 22, 24, 35, 36, 38, 40, 42, 43, 44, 63, 70, 71, 72, 78, 86, 97, 99, 102, 114 e 121) e 34 tiveram sua expressão reduzida (*spots* 1, 2, 3, 6, 12, 17, 20, 23, 26, 27, 28, 30, 41, 45, 49, 51, 52, 54, 60, 61, 62, 65, 66, 67, 81, 82, 85, 91, 103, 107, 109, 111, 120 e 123) na enxertia BRS 265/CCP 06, em relação à outra combinação de enxertia. Além disso, cinco *spots* foram detectados apenas na combinação CCP 06/CCP 06 (*spots* 4, 48, 116, 118 e 129) e 34 somente na enxertia BRS 265/CCP 06 (*spots* 5, 11, 124, 125, 126, 128, 132, 133, 134, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 160, 161, 164, 165, 167 e 168) (Figura 24).

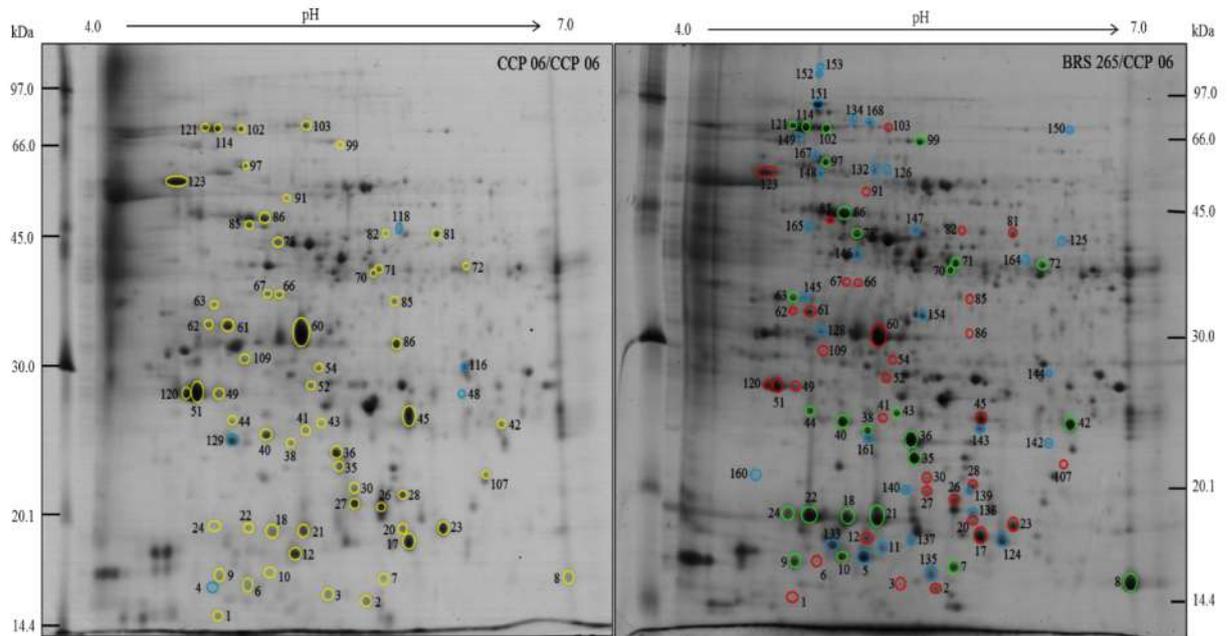


Figura 24. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinações enxerto/porta-enxerto CCP 06/CCP 06 e BRS 265/CCP 06, cultivadas por 60 dias sob condições de estresse salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes na CCP 06/CCP 06 que tiveram expressão proteica diferencial em relação à BRS 265/CCP 06. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se $0,5 \text{ mg}$ de proteína, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

Na presença de estresse salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, a comparação dos géis proteicos das folhas de cajueiro das combinações CCP 06/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 revelou uma correspondência de 449 *spots*. Os dados revelaram que, na combinação BRS 265/BRS 265, 25 *spots* proteicos apresentaram intensidade aumentada em relação à CCP 06/CCP 06 (*spots* 8, 15, 18, 21, 22, 24, 25, 36, 38, 40, 42, 53, 56, 57, 63, 69, 71, 75, 88, 97, 102, 106, 114, 121 e 155) e 17 apresentaram redução (*spots* 3, 12, 27, 48, 51, 54, 61, 62, 65, 67, 103, 104, 105, 113, 115, 120 e 123) (Figura 25). Além disso, seis proteínas foram expressas apenas na combinação de enxertia CCP 06/CCP 06 (*spots* 6, 107, 111, 116, 118 e 129) e 14 foram encontradas exclusivamente na combinação BRS 265/BRS 265 (*spots* 5, 11, 127, 128, 133, 134, 138, 147, 149, 150, 154, 156, 157 e 159).

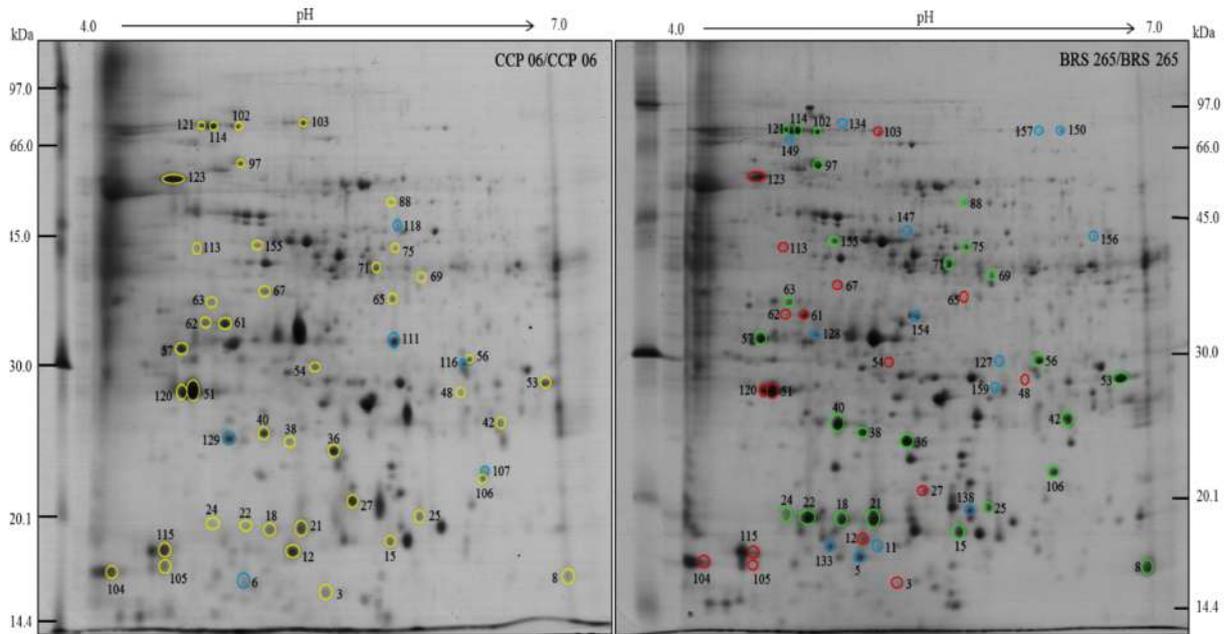


Figura 25. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinações enxerto/porta-enxerto CCP 06/CCP 06 e BRS 265/BRS 265, cultivadas por 60 dias sob condições de estresse salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes na CCP 06/CCP 06 que tiveram expressão proteica diferencial em relação à BRS 265/BRS 265. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se $0,5 \text{ mg}$ de proteína, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

Os resultados da eletroforese 2D da comparação entre as enxertias CCP 06/BRS 265 e BRS 265/CCP 06, sob condições de estresse salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$ estão apresentados na Figura 26. Nessa comparação, 420 *spots* proteicos foram analisados. Destes, 76 tiveram expressão diferencial entre estas duas enxertias, sendo que 19 *spots* proteicos apresentaram intensidade aumentada na combinação BRS 265/CCP 06 em relação à CCP 06/BRS 265 (*spots* 7, 8, 9, 10, 14, 18, 21, 22, 29, 35, 36, 37, 40, 42, 44, 50, 58, 61 e 68) e 20 apresentaram redução (*spots* 15, 27, 45, 47, 54, 65, 67, 73, 76, 80, 82, 90, 96, 98, 100, 101, 102, 109, 124 e 130). Ainda como resultado, observou-se a presença do *spot* proteico 129 apenas na enxertia CCP 06/BRS 265, enquanto 36 foram encontrados exclusivamente na enxertia BRS 265/CCP 06 (*spots* 5, 13, 24, 32, 55, 62, 63, 64, 74, 84, 85, 89, 108, 122, 133, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 150, 151, 152, 153, 154, 158, 161, 163, 166 e 167) (Figura 26).

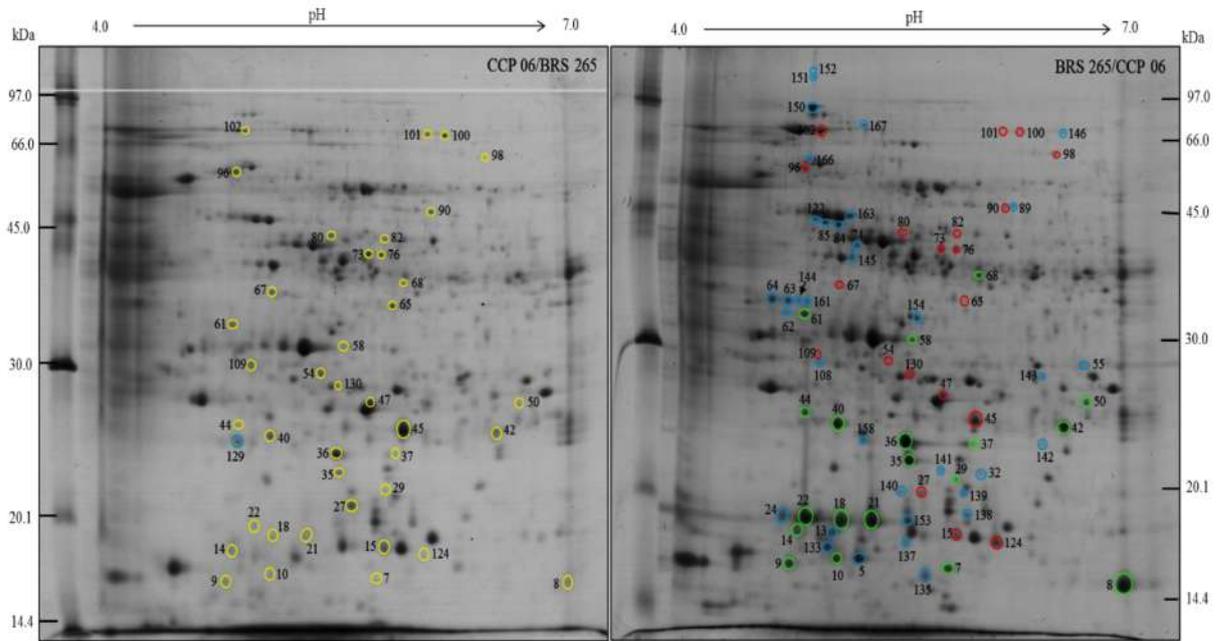


Figura 26. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinações enxerto/porta-enxerto CCP 06/BRS 265 e BRS 265/CCP 06, cultivadas por 60 dias sob condições de estresse salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes na CCP 06/BRS 265 que tiveram expressão proteica diferencial em relação à BRS 265/CCP 06. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se $0,5 \text{ mg}$ de proteína, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

Dos 410 *spots* comparados entre os géis 2D de plantas das enxertias CCP 06/BRS 265 e BRS 265/BRS 265, sob condições de estresse com água salina de CEa igual a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, 67 tiveram expressão proteica diferencial, sendo observado aumentos nas intensidades de 29 *spots* proteicos na última enxertia, em relação à primeira (*spots* 8, 14, 18, 21, 22, 29, 31, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 50, 51, 57, 61, 69, 75, 98, 102, 106, 117, 130 e 131) e redução em 20 (*spots* 39, 45, 46, 47, 54, 59, 65, 67, 73, 79, 80, 81, 82, 83, 92, 93, 100, 101, 103 e 129) (Figura 27). O *spot* 169 teve sua presença detectada apenas na combinação CCP 06/BRS 265, enquanto 17 *spots* foram encontrados somente na enxertia BRS 265/BRS 265 (*spots* 5, 24, 63, 64, 74, 89, 95, 133, 137, 138, 144, 145, 150, 151, 156, 157 e 159).

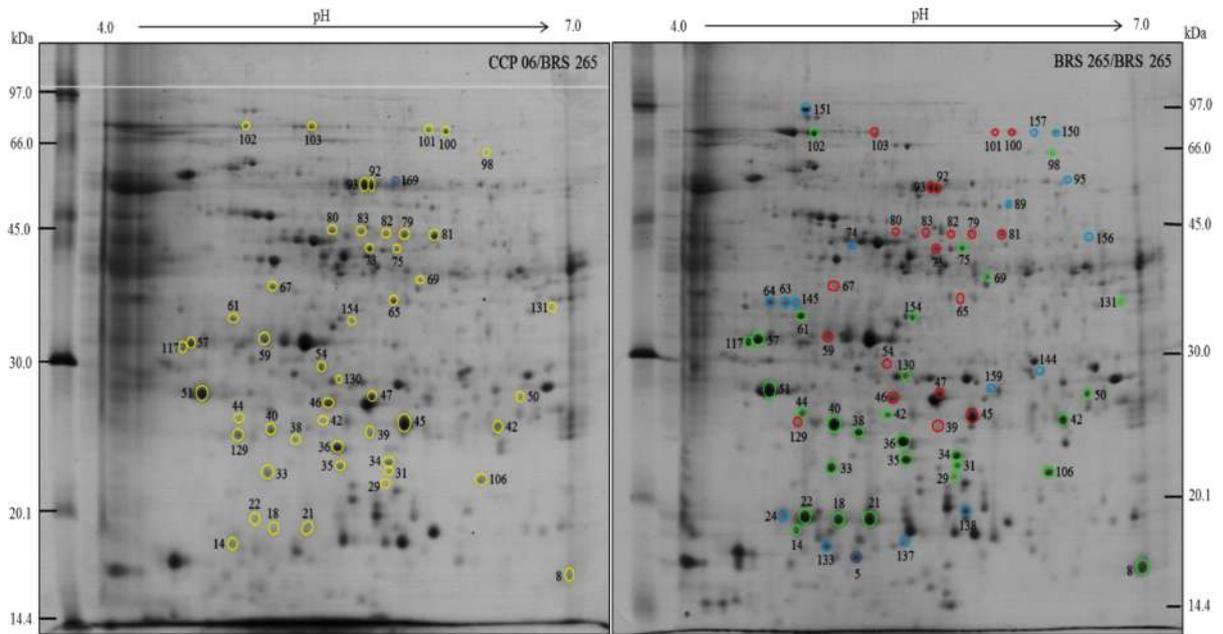


Figura 27. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinações enxerto/porta-enxerto CCP 06/BRS 265 e BRS 265/BRS 265, cultivadas por 60 dias sob condições de estresse salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes na CCP 06/BRS 265 que tiveram expressão proteica diferencial em relação à BRS 265/BRS 265. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se $0,5 \text{ mg}$ de proteína, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

Na comparação dos padrões proteicos das plantas das enxertias BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265, sob condições de estresse salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, a avaliação de 477 *spots* revelou que 10 proteínas tiveram sua expressão aumentada (*spots* 15, 16, 19, 20, 38, 51, 53, 100, 101 e 120) e oito tiveram sua expressão reduzida (*spots* 5, 10, 24, 36, 72, 77, 149 e 151) na enxertia BRS 265/BRS 265 em relação à BRS 265/CCP 06, ao passo que três foram expressas somente na combinação BRS 265/CCP 06 (*spots* 6, 161 e 168) (Figura 28).

4.6.3 Proteoma diferencial de folhas de cajueiro anão precoce porta-enxertados em resposta ao estresse salino

As análises realizadas para avaliar as proteínas responsivas ao estresse salino em plantas de cajueiro anão precoce enxertadas, sendo quatro combinações de enxerto/porta-enxerto (CCP 06/CCP 06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265), seguiram o mesmo padrão dos dois itens anteriores, porém as comparações foram feitas entre os níveis de estresse salino a $2,0$ e $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, em comparação ao controle ($0,0 \text{ dS m}^{-1}$) e, adicionalmente, entre os níveis de salinidade a $2,0$ e $4,0 \text{ dS m}^{-1}$.

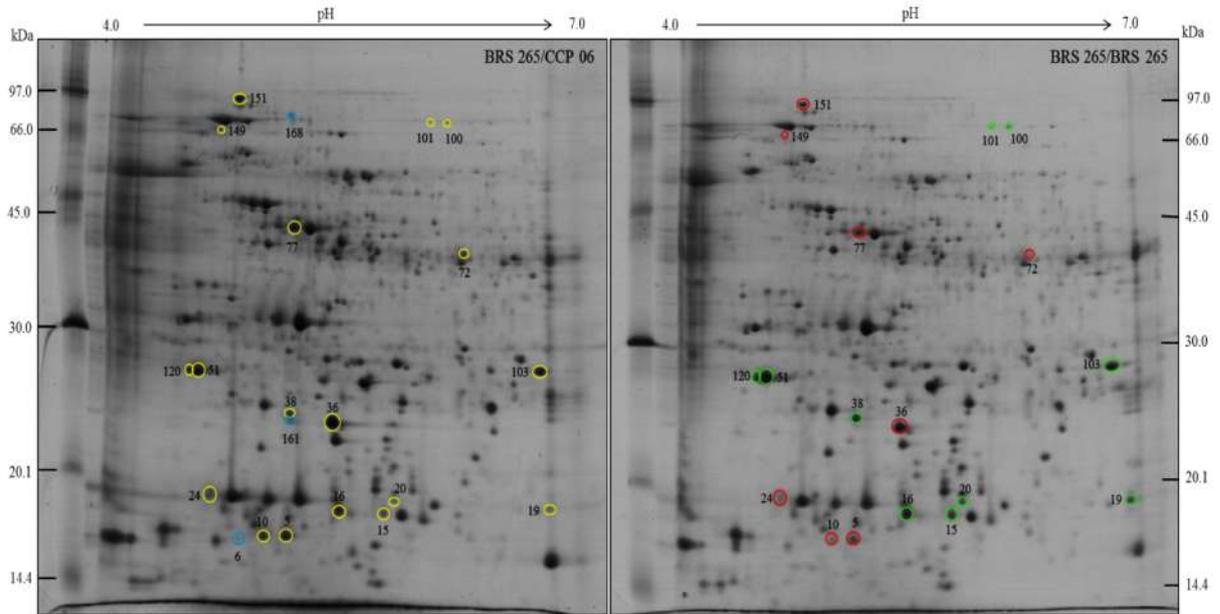


Figura 28. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinações enxerto/porta-enxerto BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265, cultivadas por 60 dias sob condições de estresse salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes na BRS 265/CCP 06 que tiveram expressão proteica diferencial em relação à BRS 265/BRS 265. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se $0,5 \text{ mg}$ de proteína, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie Blue G-250.

4.6.3.1 Comparação dos padrões eletroforéticos 2D da enxertia CCP 06/CCP 06

Em média, 621, 486 e 544 *spots*, foram detectados nos tratamentos irrigados com água destilada (controle) e sob condições de estresse salino a $2,0$ e $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, respectivamente, nas folhas da enxertia CCP 06/CCP 06. A $2,0 \text{ dS m}^{-1}$, a análise comparativa de 401 *spots* revelou que 14 proteínas tiveram sua expressão aumentada pela salinidade (*spots* 17, 23, 27, 51, 61, 97, 102, 110, 117, 177, 178, 196, 198 e 199), ao passo que 27 apresentaram expressão reduzida (*spots* 2, 18, 20, 21, 44, 45, 56, 59, 60, 63, 70, 71, 73, 77, 78, 86, 116, 129, 163, 171, 172, 173, 174, 176, 194, 195 e 197), em comparação ao controle (Figura 29).

Dos 360 *spots* proteicos analisados das plantas submetidas à CEa de $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, comparados ao controle, um total de 68 *spots* tiveram expressão diferencial, sendo que 36 tiveram a expressão aumentada (*spots* 12, 17, 23, 27, 35, 51, 57, 61, 66, 67, 85, 87, 92, 93, 97, 102, 103, 110, 111, 112, 117, 129, 157, 175, 177, 178, 179, 182, 184, 185, 187, 188, 189, 193, 294 e 311), 28 a expressão reduzida (*spots* 2, 18, 26, 36, 44, 45, 56, 59, 60, 63, 70, 73, 77, 78, 86, 115, 116, 171, 172, 173, 174, 176, 180, 181, 183, 186, 191 e 192), dois foram exclusivos do tratamento controle (*spots* 190 e 215) e dois foi detectado somente no tratamento salino (*spots* 3 e 118) (Figura 30).

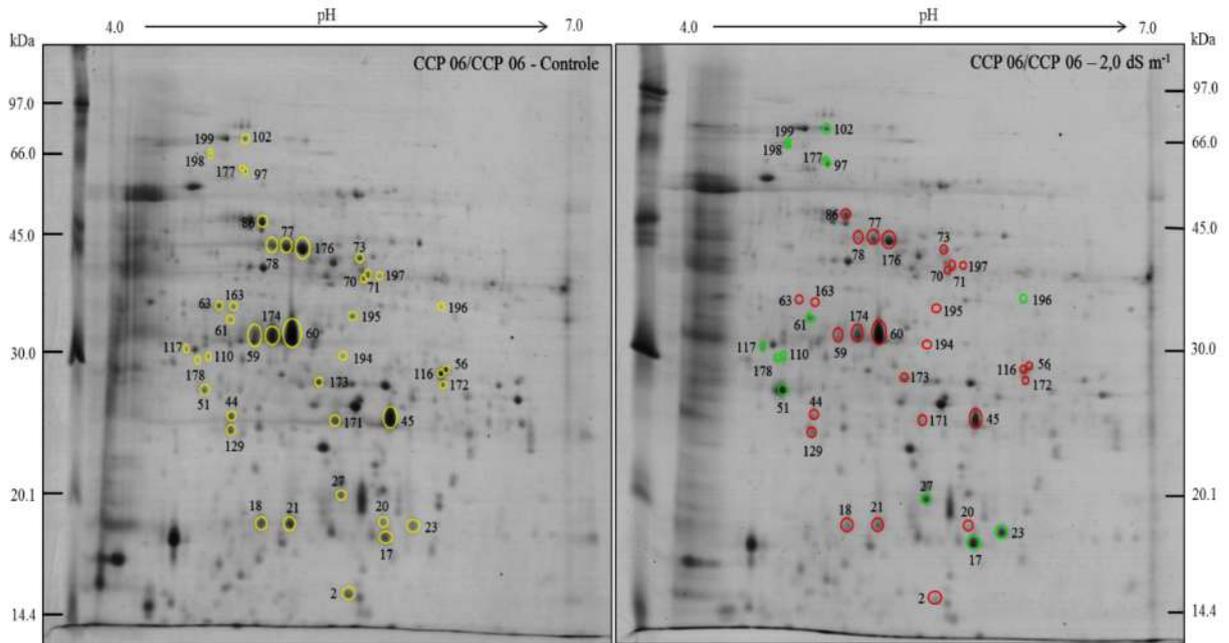


Figura 29. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinação enxerto/porta-enxerto CCP 06/CCP 06, cultivadas por 60 dias sob condições controle (água destilada) e de estresse salino a $2,0 \text{ dS m}^{-1}$. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes no controle e que tiveram expressão proteica diferencial em relação ao tratamento salino. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. Para cada gel, aplicaram-se $0,5 \text{ mg}$ de proteínas, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie coloidal.

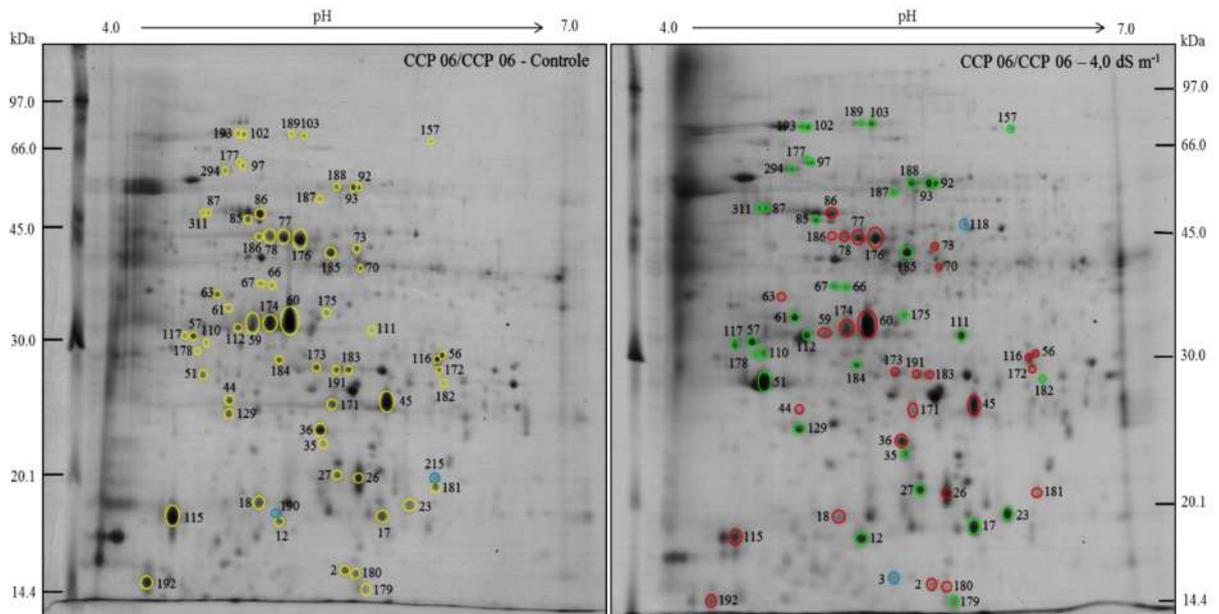


Figura 30. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinação enxerto/porta-enxerto CCP 06/CCP 06, cultivadas por 60 dias sob condições controle (água destilada) e de estresse salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes no controle e que tiveram expressão proteica diferencial em relação ao tratamento salino. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se $0,5 \text{ mg}$ de proteínas, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie coloidal.

Do total de 306 *spots* proteicos analisados das plantas sob estresse a 4,0 dS m⁻¹, em relação ao tratamento salino a 2,0 dS m⁻¹, 20 tiveram suas intensidades aumentadas (*spots* 12, 21, 28, 51, 57, 58, 61, 67, 87, 93, 103, 110, 111, 112, 129, 157, 185, 187, 200 e 201) e quatro foram reduzidas (*spots* 36, 115, 180 e 192) (Figura 31).

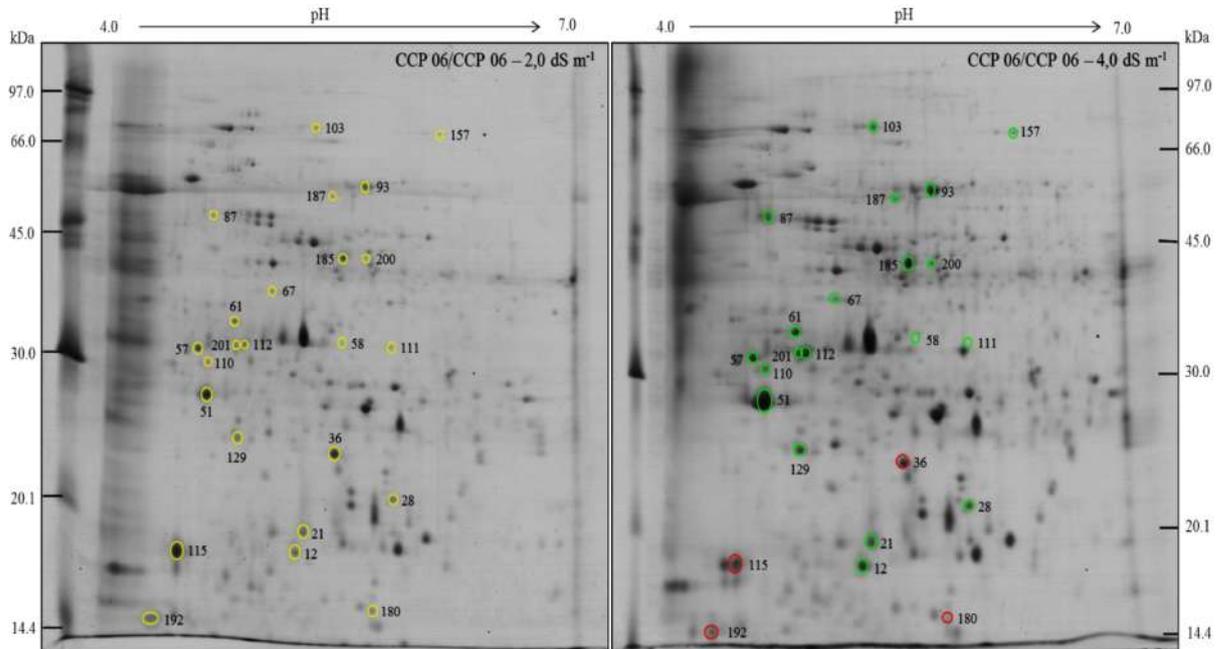


Figura 31. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinação enxerto/porta-enxerto CCP 06/CCP 06, cultivadas por 60 dias sob condições de estresse salino a 2,0 dS m⁻¹ e 4,0 dS m⁻¹. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes no estresse salino a 2,0 dS m⁻¹ e que tiveram expressão proteica diferencial em relação ao tratamento salino a 4,0 dS m⁻¹. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. Para cada gel, aplicaram-se 0,5 mg de proteínas, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie coloidal.

4.6.3.2 Comparação dos padrões eletroforéticos 2D da enxertia CCP 06/BRS 265

Em média, 576, 551 e 489 *spots* foram detectados nos padrões proteicos foliares das plantas da enxertia CCP 06/BRS 265 irrigadas com água destilada (controle) e com águas salinas a 2,0 e 4,0 dS m⁻¹, respectivamente. Foram comparados 448 *spots* proteicos entre os géis do tratamento controle e os do tratamento salino a 2,0 dS m⁻¹, em folhas de cajueiro dessa enxertia. Destes, foi observado um total de 27 *spots* diferencialmente expressos, dos quais observou-se aumento pelo estresse salino na abundância relativa de 14 *spots* proteicos (17, 35, 40, 51, 65, 100, 101, 102, 121, 129, 203, 204, 221 e 222) e redução em 13 (*spots* 26, 44, 45, 53, 56, 59, 84, 85, 116, 172, 191, 202 e 223), quando comparado ao controle (Figura 32).

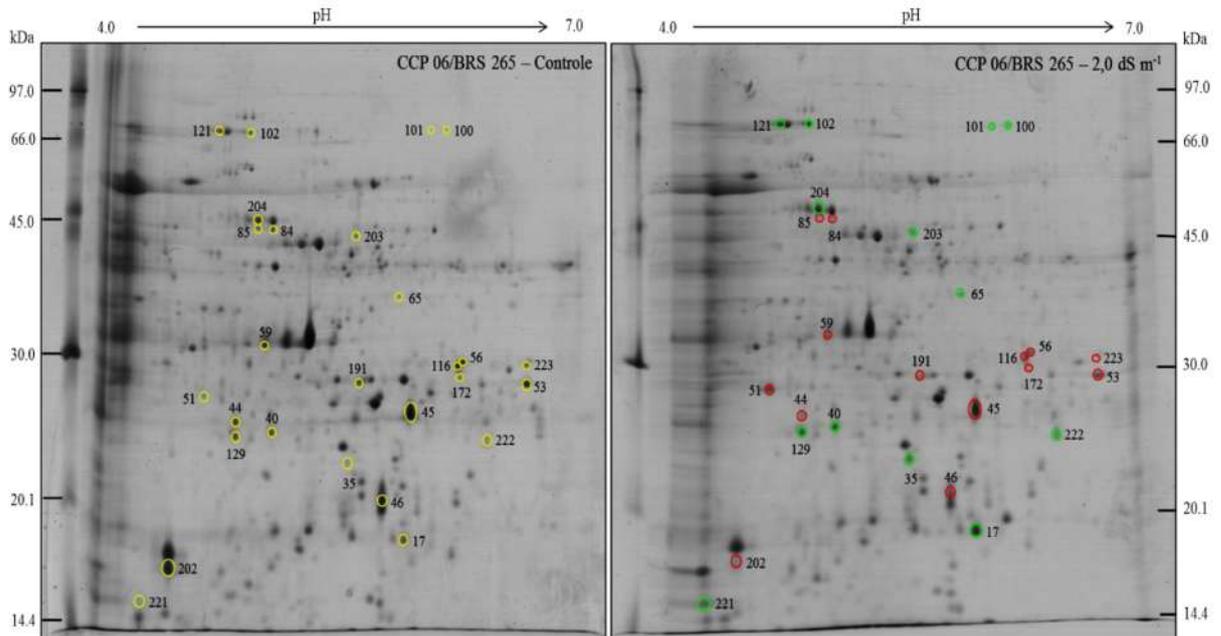


Figura 32. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinação enxerto/porta-enxerto CCP 06/BRS 265, cultivadas por 60 dias sob condições controle (água destilada) e de estresse salino a $2,0 \text{ dS m}^{-1}$. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes no controle e que tiveram expressão proteica diferencial em relação ao tratamento salino. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. Para cada gel, aplicaram-se $0,5 \text{ mg}$ de proteínas, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie coloidal.

Na comparação entre o controle e o tratamento salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, 414 *spots* foram avaliados, sendo observados incrementos na expressão de 29 polipeptídeos pela salinidade (*spots* 15, 16, 39, 51, 65, 67, 76, 79, 83, 92, 93, 94, 96, 97, 100, 101, 175, 185, 203, 204, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 218 e 246) e decréscimos na expressão de 11 (*spots* 6, 10, 18, 21, 26, 52, 116, 181, 191, 205 e 206), em relação ao controle (Figura 33). Ainda nessa comparação, verificou-se a presença de 11 *spots* apenas no tratamento controle (*spots* 63, 64, 84, 85, 102, 122, 145, 215, 216, 217 e 219), totalizando 51 *spots* diferencialmente expressos. Por outro lado, para esse mesmo enxerto/porta-enxerto (CCP 06/BRS 265), a comparação dos padrões proteicos entre os tratamentos salinos a $2,0$ e $4,0 \text{ dS m}^{-1}$ foi realizada em 361 *spots* proteicos. Destes, 38 tiveram expressão diferencial, sendo que 22 apresentaram intensidade aumentada no maior nível de salinidade (*spots* 10, 15, 16, 51, 59, 65, 73, 76, 79, 92, 93, 94, 96, 97, 100, 175, 185, 208, 211, 224, 246 e 218) e oito apresentaram redução (*spots* 7, 10, 18, 21, 35, 40, 129 e 181), em relação ao tratamento salino a $2,0 \text{ dS m}^{-1}$ (Figura 34). Além disso, oito proteínas foram expressas somente no estresse salino a $2,0 \text{ dS m}^{-1}$ (*spots* 63, 64, 84, 85, 145, 202, 215 e 219).

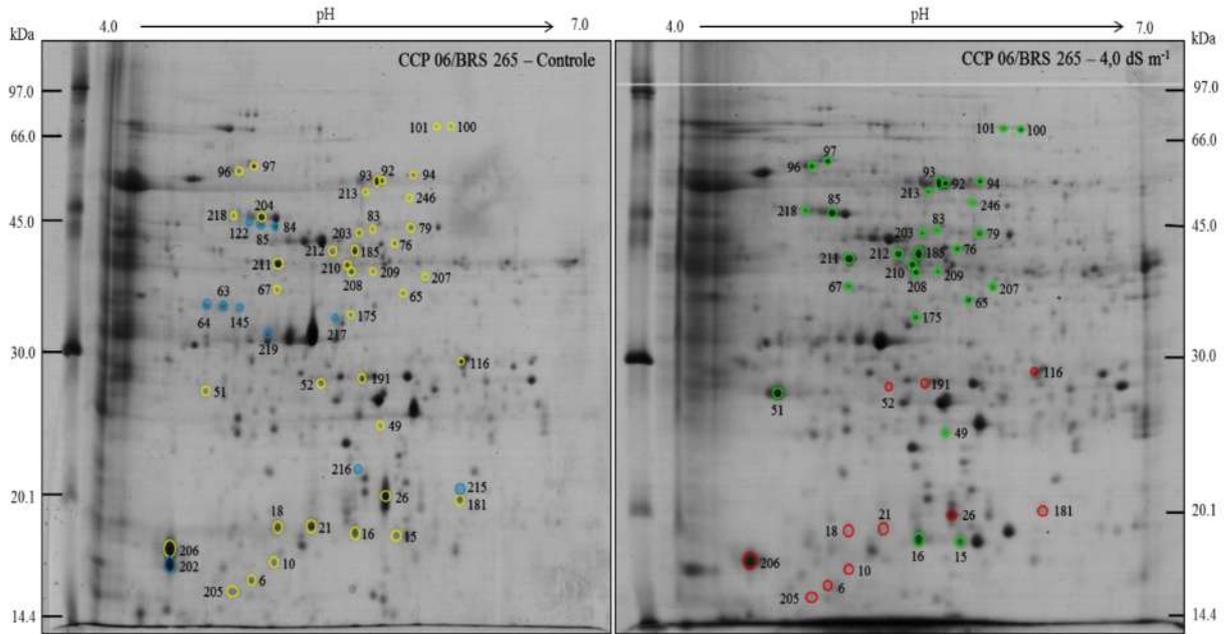


Figura 33. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinação enxerto/porta-enxerto CCP 06/BRS 265, cultivadas por 60 dias sob condições controle (água destilada) e de estresse salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes no controle e que tiveram expressão proteica diferencial em relação ao tratamento salino. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se $0,5 \text{ mg}$ de proteínas, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie coloidal.

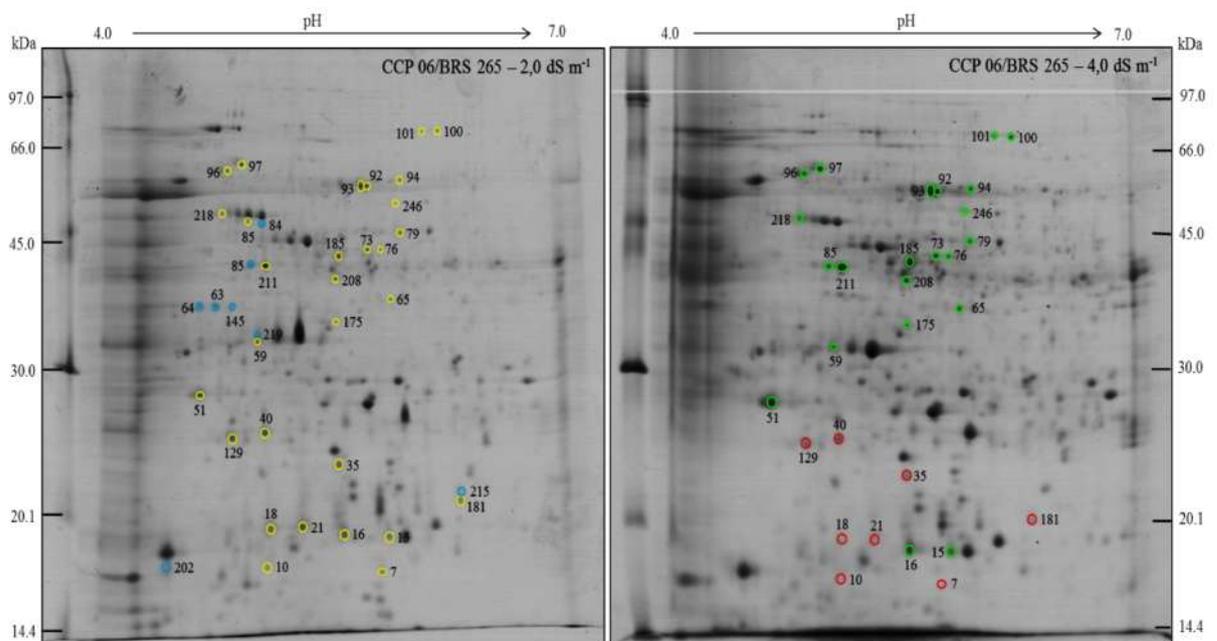


Figura 34. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinação enxerto/porta-enxerto CCP 06/BRS 265, cultivadas por 60 dias sob condições de estresse salino a $2,0 \text{ dS m}^{-1}$ e $4,0 \text{ dS m}^{-1}$. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes no estresse salino a $2,0 \text{ dS m}^{-1}$ e que tiveram expressão proteica diferencial em relação ao tratamento salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada

somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se 0,5 mg de proteínas, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie coloidal.

4.6.3.3 Comparação dos padrões eletroforéticos 2D da enxertia BRS 265/CCP 06

Os padrões eletroforéticos 2D das folhas das plantas de cajueiro anão precoce, enxerto/porta-enxerto BRS 265/CCP 06, irrigadas com água destilada (controle) e com águas salinas a, 2,0 e 4,0 dS m⁻¹ apresentaram, em média, os totais de 553, 512 e 862 *spots*, respectivamente. Dos 387 *spots* analisados na comparação entre os padrões proteicos dos géis do controle e do tratamento de estresse salino a 2,0 dS m⁻¹ foram identificadas diferenças na expressão de 39, sendo que 12 polipeptídeos tiveram aumento de expressão pela salinidade (*spots* 10, 17, 27, 200, 212, 225, 228, 233, 246, 250, 272 e 278) e 17 tiveram sua expressão reduzida (*spots* 11, 33, 35, 42, 51, 92, 107, 114, 123, 132, 135, 173, 188, 226, 242, 248, 271), em relação ao controle (Figura 35), enquanto três polipeptídeos foram detectados apenas no tratamento controle (*spots* 73, 218 e 255) e sete apenas no tratamento a 2,0 dS m⁻¹ (*spots* 2, 97, 119, 180, 229, 267 e 274).

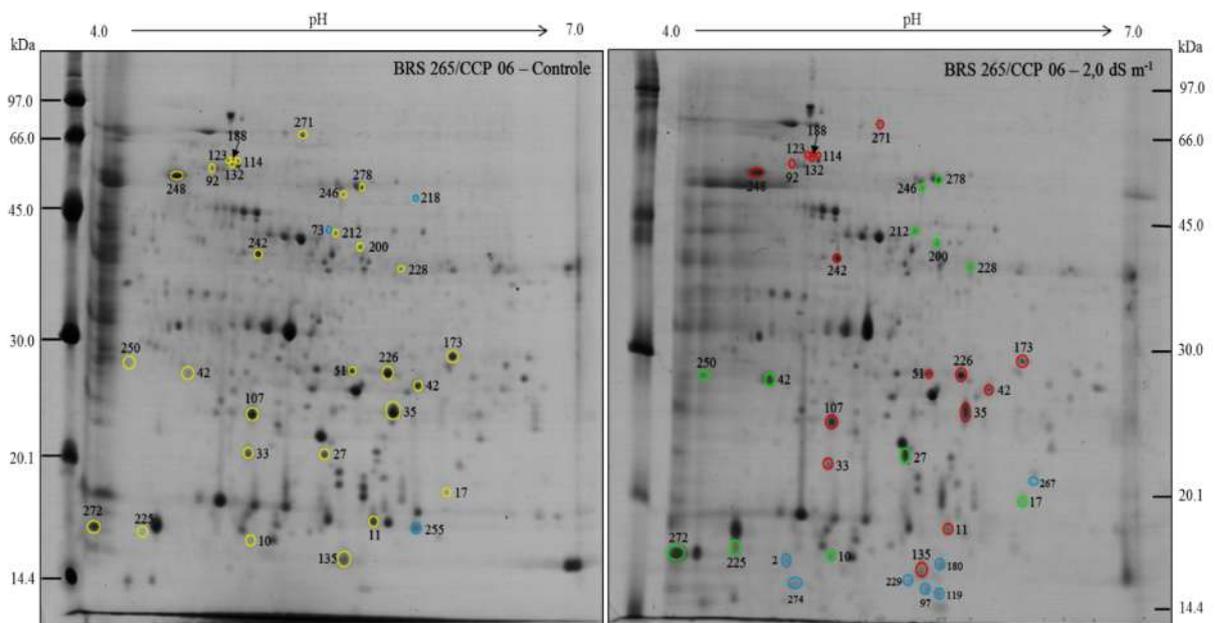


Figura 35. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinação enxerto/porta-enxerto BRS 265/CCP 06, cultivadas por 60 dias sob condições controle (água destilada) e de estresse salino a 2,0 dS m⁻¹. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes no controle e que tiveram expressão proteica diferencial em relação ao tratamento salino. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se 0,5 mg de proteínas, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie coloidal.

A análise de 489 *spots* proteicos das plantas submetidas ao tratamento salino a 4,0 dS m⁻¹, em relação ao controle, mostrou que 125 polipeptídeos tiveram expressão diferencial, sendo que 61 aumentaram sua expressão pela salinidade (*spots* 5, 10, 11, 14, 21, 35, 36, 42, 51, 53, 57, 61, 64, 68, 71, 72, 77, 86, 92, 102, 114, 120, 124, 132, 147, 154, 175, 181, 184, 185, 188, 203, 204, 208, 209, 210, 212, 213, 218, 225, 228, 229, 232, 234, 236, 237, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252 e 256) e 21 tiveram sua expressão reduzida (*spots* 15, 27, 30, 33, 40, 45, 54, 56, 67, 60, 103, 123, 135, 183, 191, 217, 226, 227, 231, 233 e 235), em relação ao controle (Figura 36). Por outro lado, 43 *spots* foram detectados somente no tratamento salino (*spots* 2, 3, 6, 7, 9, 55, 62, 69, 89, 98, 99, 110, 139, 141, 144, 145, 148, 149, 153, 168, 180, 205, 230, 238, 253, 254, 255, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 274 e 292).

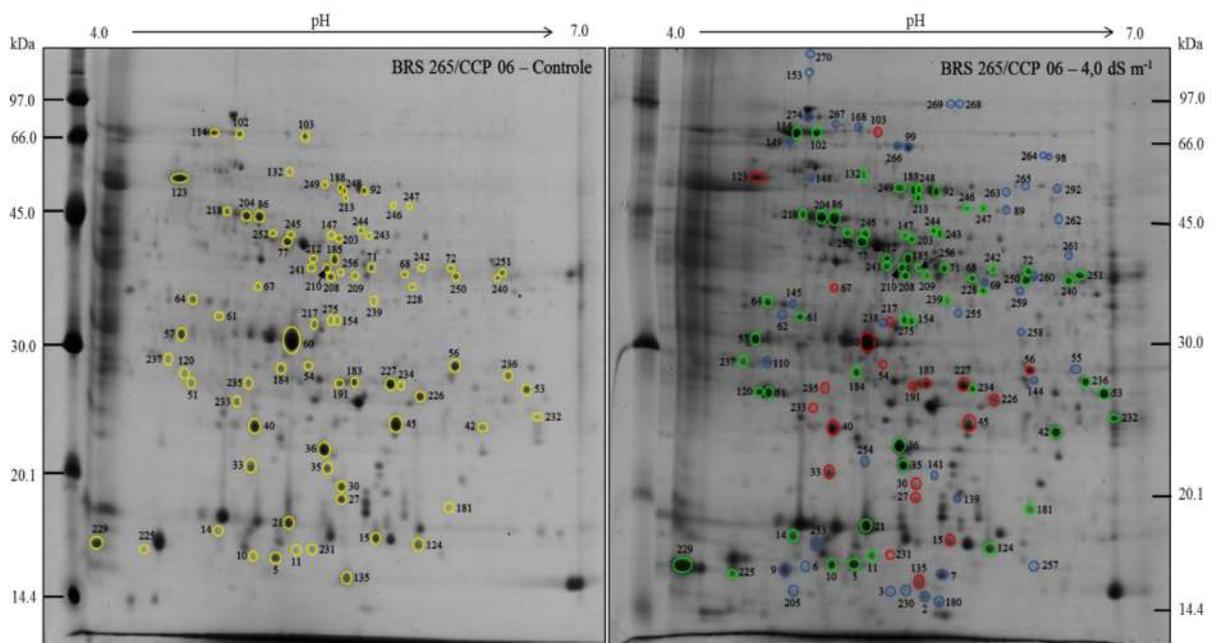


Figura 36. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinação enxerto/porta-enxerto BRS 265/CCP 06, cultivadas por 60 dias sob condições controle (água destilada) e de estresse salino a 4,0 dS m⁻¹. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes no controle e que tiveram expressão proteica diferencial em relação ao tratamento salino. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se 0,5 mg de proteínas, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie coloidal.

Ainda com relação à enxertia BRS 265/CCP 06, a comparação dos padrões proteicos entre os tratamentos salinos a 2,0 e 4,0 dS m⁻¹ mostraram uma correspondência entre 402 *spots* proteicos, sendo observada expressão diferencial entre 96 polipeptídeos. Destes, 42

apresentaram intensidade aumentada no maior nível de salinidade (*spots* 7, 9, 17, 21, 36, 41, 42, 53, 57, 61, 71, 72, 77, 97, 107, 119, 132, 154, 173, 175, 184, 185, 188, 204, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 228, 237, 240, 243, 244, 248, 249, 250, 252, 253 e 279) e 12 apresentaram redução (*spots* 26, 30, 45, 54, 60, 65, 104, 163, 205, 230, 231 e 233), em relação ao tratamento salino a $2,0 \text{ dS m}^{-1}$ (Figura 37). Um *spot* proteico (*spot* 106) foi encontrado apenas no tratamento salino a $2,0 \text{ dS m}^{-1}$ enquanto que 41 foram detectados somente no tratamento salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$ (*spots* 3, 6, 14, 55, 62, 69, 89, 98, 99, 110, 124, 130, 139, 144, 145, 147, 148, 149, 168, 200, 238, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 273, 275, 276, 278, 277, 280 e 292).

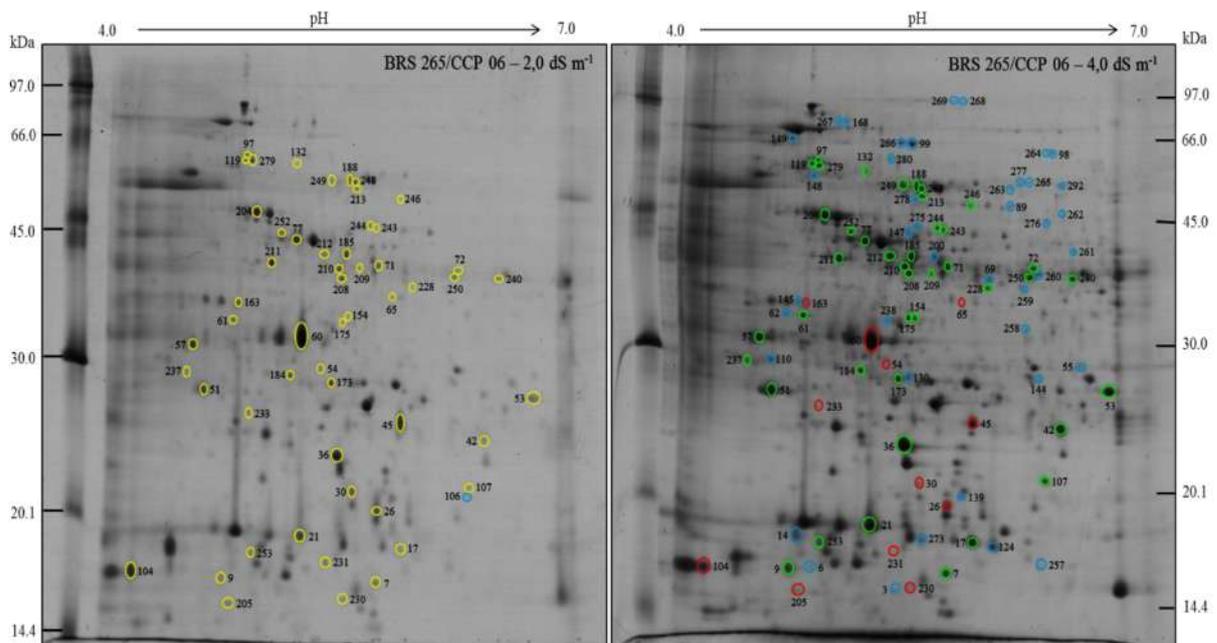


Figura 37. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinação enxerto/porta-enxerto BRS 265/CCP 06, cultivadas por 60 dias sob condições de estresse salino a $2,0 \text{ dS m}^{-1}$ e $4,0 \text{ dS m}^{-1}$. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes no estresse salino a $2,0 \text{ dS m}^{-1}$ e que tiveram expressão proteica diferencial em relação ao tratamento salino a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se $0,5 \text{ mg}$ de proteínas, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie coloidal.

4.6.3.1 Comparação dos padrões eletroforéticos 2D da enxertia BRS 265/BRS 265

Em média, 603, 520 e 724 *spots* proteicos foram detectados nos géis 2D dos tratamentos salinos irrigados com água destilada (controle) e soluções salinas a $2,0$ e $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, respectivamente, nas plantas da combinação de enxertia BRS 265/BRS 265. No tratamento salino a $2,0 \text{ dS m}^{-1}$, a análise comparativa de 469 *spots* revelou que cinco proteínas

tiveram sua expressão aumentada (*spots* 35, 51, 90, 230 e 244), ao passo que 15 apresentaram expressão reduzida (*spots* 2, 31, 34, 40, 45, 56, 59, 60, 63, 135, 151, 171, 174, 191 e 229), em relação ao controle (Figura 38); cinco proteínas foram observadas apenas no controle (*spots* 139, 216, 281, 307 e 308) e uma proteína foi encontrada apenas no tratamento salino a 2,0 dS m⁻¹ (*spot* 61). Portanto, para essa comparação, um total de 26 proteínas foram expressas diferencialmente.

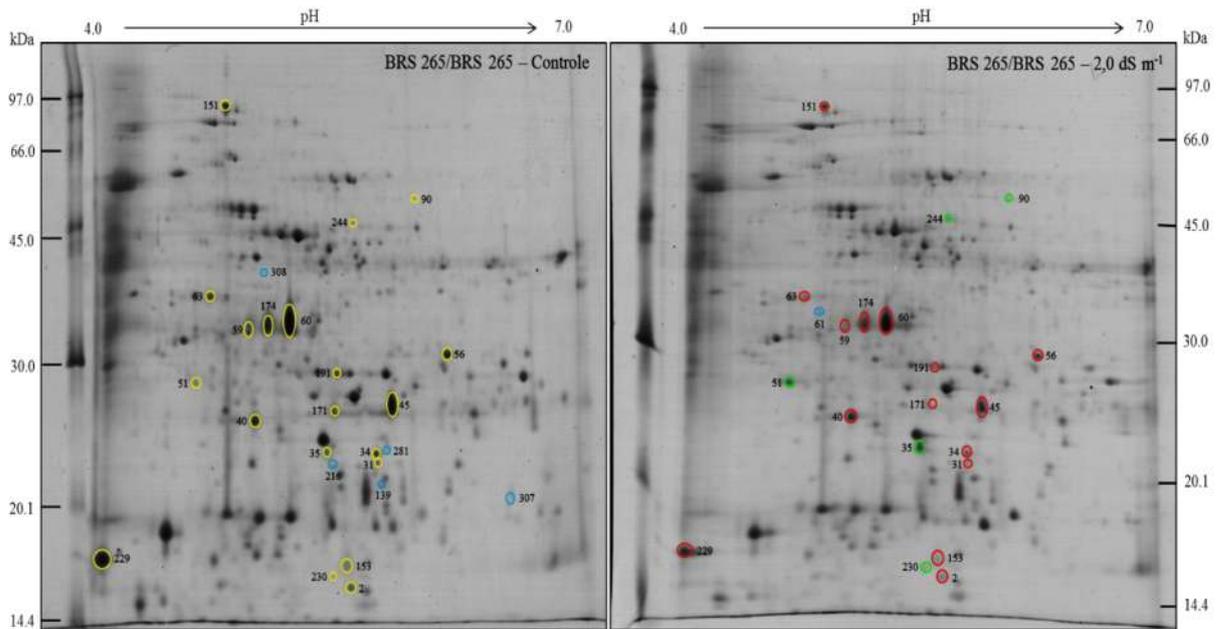


Figura 38. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinação enxerto/porta-enxerto BRS 265/BRS 265, cultivadas por 60 dias sob condições controle (água destilada) e de estresse salino a 2,0 dS m⁻¹. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes no controle e que tiveram expressão proteica diferencial em relação ao tratamento salino. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se 0,5 mg de proteínas, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie coloidal.

Na comparação entre o controle e o tratamento salino a 4,0 dS m⁻¹, a avaliação de 512 *spots* proteicos revelou que 52 proteínas tiveram aumentos em sua expressão (*spots* 14, 17, 19, 38, 43, 49, 50, 51, 53, 57, 58, 71, 75, 76, 88, 94, 97, 102, 106, 110, 114, 117, 121, 120, 147, 154, 175, 184, 185, 187, 213, 228, 232, 236, 240, 244, 246, 247, 248, 250, 259, 266, 277, 284, 285, 286, 288, 289, 290, 291, 294 e 302) e 23 tiveram redução (*spots* 2, 30, 45, 56, 59, 60, 63, 77, 78, 128, 135, 163, 171, 174, 191, 195, 196, 206, 215, 218, 229, 282 e 298), em relação ao controle (Figura 39), enquanto oito proteínas foram expressas somente no controle (*spots* 66, 161, 216, 281, 283, 295, 297 e 306) e 22 foram expressas apenas no tratamento a 4,0 dS m⁻¹ (*spots* 61, 62, 69, 95, 89, 90, 98, 252, 253, 260, 268, 276, 287, 293, 292, 296, 299,

300, 301, 303, 304 e 305), sendo observado, portanto, um total de 105 *spots* proteicos com expressão diferencial para essa comparação.

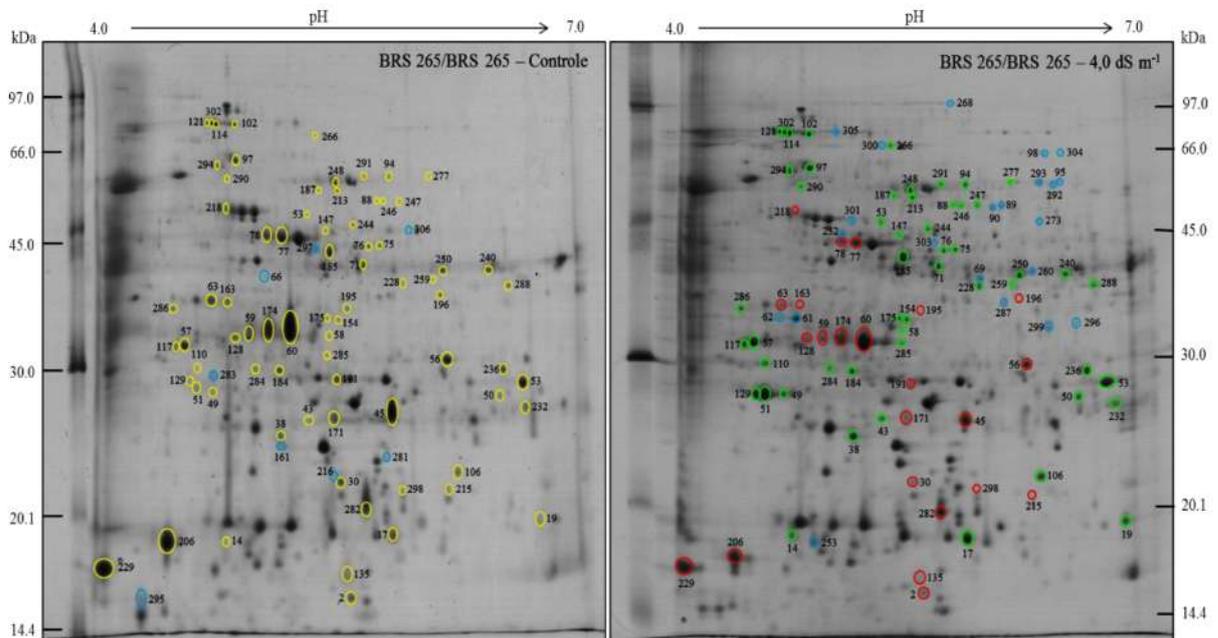


Figura 39. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinação enxerto/porta-enxerto BRS 265/BRS 265, cultivadas por 60 dias sob condições controle (água destilada) e de estresse salino a 4,0 dS m⁻¹. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes no controle e que tiveram expressão proteica diferencial em relação ao tratamento salino. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se 0,5 mg de proteínas, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie coloidal.

Os padrões eletroforéticos 2D das proteínas expressas nas folhas das plantas da enxertia BRS 265/BRS 265, nos tratamentos salinos a 2,0 e 4,0 dS m⁻¹, são apresentados na Figura 40. Dos 440 *spots* comparados, houve alteração na expressão de 29 proteínas, sendo que 15 mostraram aumentos nas suas expressões no maior nível de estresse salino (*spots* 16, 21, 38, 40, 53, 51, 61, 99, 120, 154, 175, 236, 240, 288 e 309) e apenas uma diminuiu sua expressão (*spot* 196), em relação ao tratamento salino a 2,0 dS m⁻¹. Por outro lado, 13 proteínas foram observadas somente no tratamento salino a 4,0 dS m⁻¹ (*spots* 62, 95, 98, 110, 124, 127, 130, 144, 264, 276, 303, 304 e 310) (Figura 40).

No decorrer do processo de aclimação ao estresse salino, as plantas necessitam de energia extra para restabelecer a homeostase. Segundo Kosová *et al.* (2011), isto significa um redirecionamento do metabolismo vegetal a partir do crescimento e desenvolvimento de ativos para a aclimação ao estresse. Estas extensas mudanças no metabolismo devido à salinidade é refletida também no proteoma.

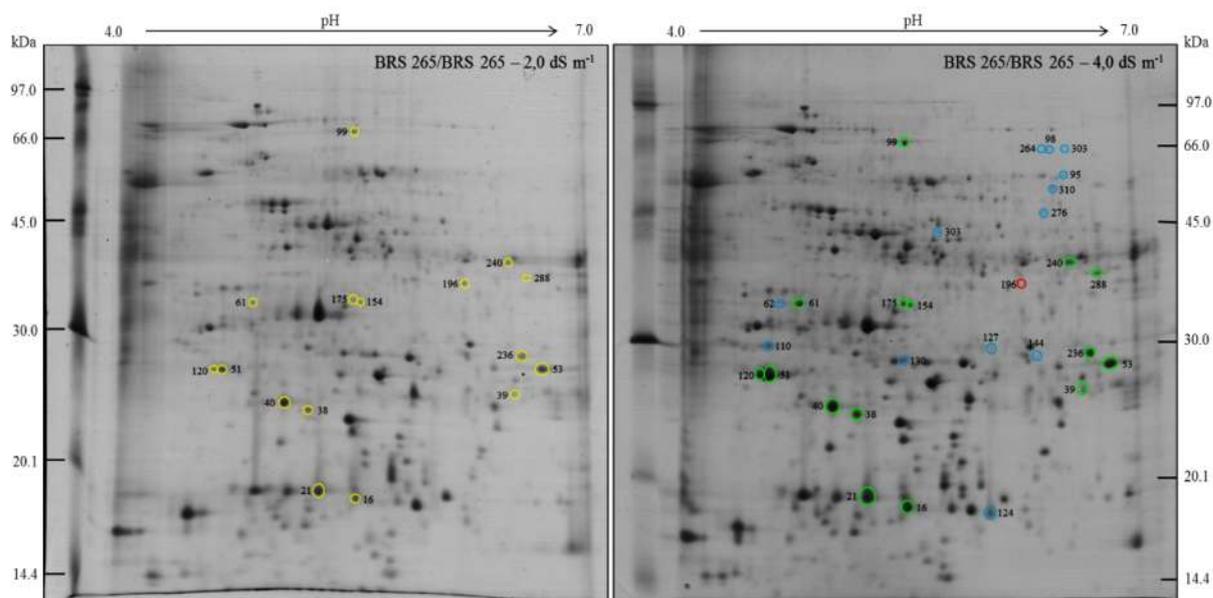


Figura 40. Comparação dos padrões eletroforéticos 2D de folhas de plantas de cajueiro anão precoce, combinação enxerto/porta-enxerto BRS 265/CCP 06, cultivadas por 60 dias sob condições de estresse salino a 2,0 dS m⁻¹ e 4,0 dS m⁻¹. Os *spots* marcados com círculos amarelos representam aqueles presentes no estresse salino a 2,0 dS m⁻¹ e que tiveram expressão proteica diferencial em relação ao tratamento salino a 4,0 dS m⁻¹. Os *spots* marcados com círculos verdes e vermelhos representam aqueles que apresentaram, na expressão das proteínas, aumento e redução, respectivamente. *Spots* marcados em azul tiveram sua expressão observada somente no tratamento em que se encontra presente. Para cada gel, aplicaram-se 0,5 mg de proteínas, sendo os *spots* visualizados após coramento com Coomassie coloidal.

Diversos estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de investigar as alterações nos padrões de expressão das proteínas (proteoma) em diferentes espécies e cultivares de plantas causadas pelo estresse salino. Como exemplo, podem ser citados os trabalhos realizados com ervilha (*Pisum sativum* L., KAV *et al.*, 2004), trigo (*Triticum durum* L.; CARUSO *et al.*, 2008), painço (*Setaria italica* L., VEERANAGAMALLAIAH *et al.* 2008), videira (*Vitis vinifera*, JELLOULI *et al.*, 2008), soja (*Glycine max* L., AGHAEI *et al.*, 2009) e milho (*Zea mays*., MENG *et al.*, 2014). Portanto, atualmente, a proteômica é uma abordagem amplamente utilizada para identificar possíveis mecanismos de tolerância à salinidade. Assim como nesses estudos, nossos resultados mostram alterações significativas nos padrões eletroforéticos 2D. Tais alterações dependeram das combinações de enxertia e como variaram com as doses de sais.

4.6.4 Proteínas identificadas por espectrometria de massa

Neste trabalho, do total de *spots* analisados em todos os tratamentos, 347 apresentaram modulação diferencial, com índice de variação igual ou superior a 1,4 vezes, sendo esses *spots* apresentados nos resultados apresentados acima. Destes, 151 foram selecionados e

submetidos à digestão tríplica, seguido por identificação por LC-ESI-MS/MS e pesquisas em bancos de dados de bioinformática. Tais *spots* foram selecionados tendo em vista que foram os que mais se repetiram entre os tratamentos analisados. A tabela 1 apresenta a identificação das proteínas, o número do *spot*, o número de acesso da proteína no banco de dados (NCBI), o organismo vegetal de referência, a função biológica da proteína, a sequência de peptídeos, os valores de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (teóricos e experimentais), o *score* e a cobertura da sequência peptídica.

Os pIs e as massas moleculares teóricos e experimentais foram diferentes para a maioria das proteínas identificadas (Tabela 1). Este fato provavelmente ocorreu em função da presença de diferentes isoformas da proteína, modificação pós-traducional ou degradação proteica (GAO *et al.*, 2009). Conforme apresentado na figura 41A, nas análises por espectrometria de massas, foi possível a identificação de 128 proteínas (85%) e 23 potipeptídeos (15%) não foram encontrados nos bancos de dados consultados, com exceção do *spot* 116 que foi identificado como uma proteína não caracterizada (LOC1000194029). Das proteínas identificadas, como pode ser observado na figura 41B, 27,3% estão envolvidas com o metabolismo fotossintético; 25,0% com o metabolismo energético/reserva; 13,3% com as respostas à estresses; 10,2% com o metabolismo dos carboidratos; 7,0% com o metabolismo secundário; 7,0% com o metabolismo dos aminoácidos; 5,5% com o metabolismo energético; 3,1% com o metabolismo antioxidativo e 1,6% relacionado a parte estrutural.

Como pode ser observado na Tabela 1, várias proteínas com diferentes funções biológicas foram observadas entre os tratamentos avaliados nas plantas enxertadas de cajueiro anão precoce quando submetidas ao estresse salino (Tabela 1). Destas, várias proteínas estão associadas aos processos relacionados à fotossíntese. Entre elas, estiveram presentes proteínas do complexo de evolução do oxigênio, proteínas que compõem o complexo citocromo b6f, ativase da rubisco e a subunidade maior da carboxilase/oxigenase da ribulose-1,5-bifosfato (Rubisco) (ANEXO 1 - Tabela 1). Como visto na figura 8, a fotossíntese líquida (*A*) foi afetada pela salinidade e a combinação enxerto/porta-enxerto atenuou esse efeito adverso. Uma das razões pelas quais a *A* foi menos afetada pela salinidade, nas plantas da enxertia BRS 265/CCP 06, parece ter sido a indução da expressão de proteínas relacionadas ao processo fotossintético, como a subunidade maior da Rubisco e a ativase da rubisco. É provável que outras proteínas do metabolismo fotossintético também tenham sido afetadas, mas que não foram identificadas na espectrometria de massas.

A ativase da Rubisco promove a regulação da atividade da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), fazendo a remoção, via hidrólise do ATP, de açúcares fosfatados inibitórios (ribulose-1,5-bifosfato) ligados ao seu sítio ativo, de forma que o CO₂ possa ativar a enzima através da carbamilação (KANG *et al.*, 2012). Esta enzima, como apresentado na Tabela 1, foi detectada em 13 *spots* (55, 58, 70, 77, 78, 84, 85, 86, 87, 122, 163, 218 e 228) e, de modo geral, apresentaram aumentos nas plantas enxertadas BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265. Dessa forma, o aumento da abundância da ativase da rubisco provavelmente ocorreu para promover a manutenção da assimilação de CO₂ sob condições de estresse salino (ABREU *et al.*, 2014), o que pode ser observado nos resultados de trocas gasosas (figura 8). Similarmente, vários autores reportaram que a ativase da Rubisco tem sua expressão aumentada em resposta a diversos estresses abióticos, tais como baixas temperaturas, estresse hídrico e estresse salino (GAO *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011; KOSOVÁ *et al.*, 2011; DEEBA *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2012).

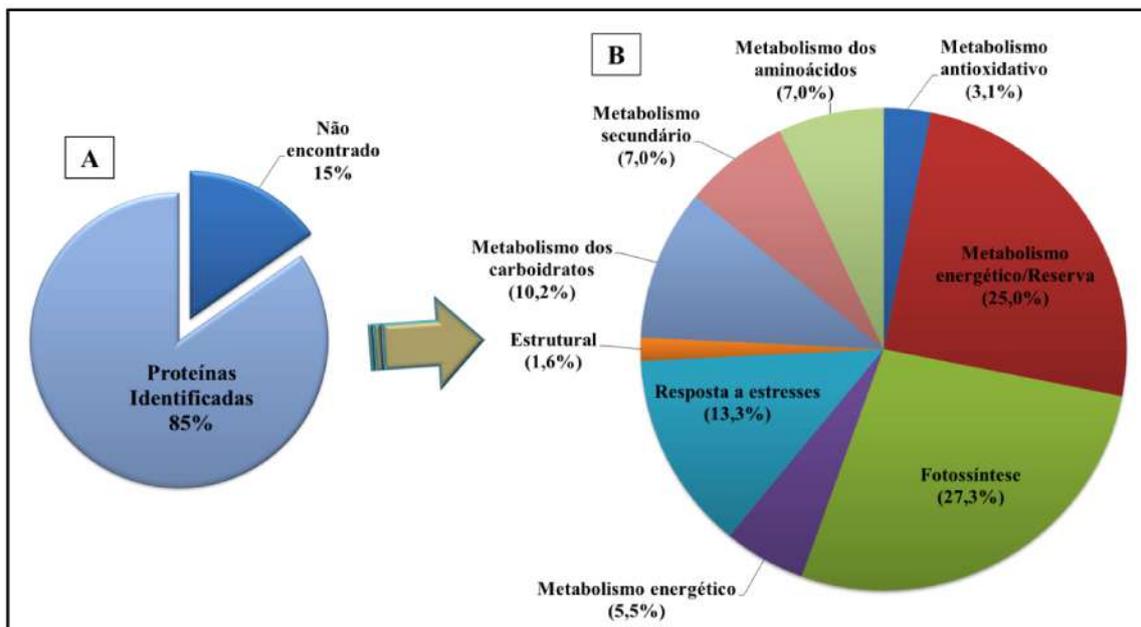


Figura 41. Classes funcionais das proteínas diferencialmente expressas nas folhas das plantas de cajueiro anão precoce, combinações de enxerto/porta-enxerto CCP 06/CCP 06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265, em função do estresse salino. (A) Percentual de proteínas identificadas, em relação ao total de *spots* proteicos analisados, usando o programa MASCOT, através de pesquisas no banco de dados, NCBI; (B) Classificação funcional das proteínas identificadas, com os respectivos percentuais, de acordo com o banco de dados UniProt. As proteínas utilizadas para estes diagramas estão descritas na Tabela 1.

A subunidade maior (α) da Rubisco foi intensamente modulada pela salinidade nas plantas de cajueiro estudadas, sendo detectada em 11 *spots* (36, 38, 40, 42, 97, 119, 148, 161, 167, 177 e 196) (Tabela 1). Esse número de *spots* proteicos juntamente com as diferenças

encontradas na massa molecular e/ou o pI das proteínas sugere a ocorrência de fragmentação parcial ou degradação das proteínas correspondentes às subunidades maiores dessa proteína. Adicionalmente, os dados obtidos da tabela 1 fornecem indícios que modificações pós-traducionais, tais como glicosilação, fosforilação, dentre outras, podem ter resultado em alterações na massa molecular e/ou pI das proteínas, resultando em um maior número de isoformas (CARUSO *et al.*, 2008; MESQUITA *et al.*, 2012).

A Rubisco catalisa a reação de uma molécula de CO₂ com a ribulose-1,5-bisfosfato, gerando duas moléculas de 3-fosfoglicerato. Esta reação corresponde ao primeiro passo do processo de assimilação do carbono, que ocorre no ciclo de Calvin. Em resposta ao estresse salino, as plantas das enxertias BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265 aumentaram drasticamente o nível de expressão de algumas isoformas da Rubisco, sendo registrados incrementos nos *spots* 36, 38, 40, 42, e 119 (Tabela 1), enquanto que nas plantas das enxertias CCP 06/CCP 06 e CCP 06/ BRS 265 foram observadas reduções nas intensidades desses mesmos *spots*. É interessante ressaltar, que as isoformas da Rubisco correspondentes aos *spots* proteicos 148, 161 e 167 foram expressos apenas nas folhas das plantas da enxertia BRS 265/CCP 06, justamente aquela que apresentou melhores resultados com relação à tolerância à salinidade (item 4.2). Em genótipos de feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.) com tolerância diferencial à salinidade, o padrão protéico de expressão da Rubisco foi diretamente correlacionado com as plantas mais tolerantes (ABREU *et al.*, 2014). Os autores relataram que no cultivar TVu, sensível ao estresse salino, a expressão da Rubisco foi reduzida na presença de NaCl, enquanto que no cultivar Pitiúba (tolerante) ela aumentou. Deeba *et al.* (2012) demonstraram que a redução na expressão da Rubisco em plantas de algodão (*Gossypium herbaceum* L.), sob estresse hídrico, foi associada diretamente com as reduções observadas nas taxas fotossintéticas. Adicionalmente, Zörb *et al.* (2004) observaram aumentos nos níveis de expressão das subunidades α e β da Rubisco em plantas de milho (*Zea mays*) sob condições de estresse salino.

As proteínas do complexo de evolução do oxigênio (CEO), fundamentais nos processos fotossintéticos, também apresentaram modulação diferencial em função dos tratamentos aplicados. Tais proteínas formam um complexo proteico composto por três subunidades (CEO1, CEO2 e CEO3), que são codificadas pelo genoma nuclear e estão associadas periféricamente ao fotossistema II, no lúmen dos tilacóides (SUGIHARA *et al.*, 2000). As proteínas do CEO1 e do CEO2 foram identificadas em quatro *spots* proteicos (35, 45, 60 e 171). Como pode ser observado nos resultados dos géis 2D, de modo geral, as

isoformas das proteínas do CEO, identificadas nos *spots* proteicos 45, 60 e 171 (Tabela 1) tiveram as abundâncias relativas reduzidas pela salinidade, enquanto que a isoforma correspondente ao *spot* 35 desse complexo proteico (Tabela 1) apresentou aumento de expressão. Diversos estudos associaram o envolvimento das proteínas CEO1 e CEO2 com os processos de aclimação de plantas aos estresses abióticos, tais como, os estresse salino (KANG *et al.*, 2012) e hídrico (ALI *et al.*, 2006).

Proteínas com função na cadeia transportadora de elétrons no cloroplasto, tais como as do complexo dos citocromos b6f, também foram detectadas nas análises de espectrometria de massas (*spots* 180, 181 e 215). Esse complexo proteico está envolvido com a transferência de elétrons e bombeamento de prótons para produção de energia. Outras proteínas diferencialmente expressas nas folhas relacionadas ao metabolismo fotossintético também foram encontradas, tais como a ribose-3-fosfato-epimerase (*spot* 48) e a cloroplasto PsbO4 (*spot* 174).

Nas amostras analisadas por espectrometria de massas, também foram detectadas proteínas relacionadas ao metabolismo energético/reserva, sendo a grande maioria identificada como a legumina A (*spots* 14, 18, 20, 21, 24, 30, 31, 34, 39, 44, 49, 51, 59, 69, 83, 88 e 89; tabela 1). Surpreendentemente, esta proteína pertence a famílias de proteínas que atuam na reserva de nutrientes em vacúolos de *Jatropha curcas*. Nas plantas, há uma exigência de aminoácidos e nutrientes a serem utilizados de seus reservatórios celulares durante estresses abióticos, acarretando uma alta expressão de proteínas relacionadas a armazenamento de nutrientes (REIS, 2009). Na literatura pesquisada, há relato sobre a presença de uma legumina e de outras proteínas de reserva em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) (CROCE, 2002).

A análise por espectrometria de massas revelou a presença de enzimas associadas ao metabolismo dos carboidratos (Tabela 1). Dentre elas, foram detectadas a triosefosfato-isomerase (*spots* 53, 130, 172, 173, 191 e 236), a β -1,3-glucanase (*spots* 61 e 62), a frutoquinase (*spots* 66 e 67), a fosforribuloquinase (*spots* 185 e 212) e a sedoepulose-1,7-bifosfatase (*spot* 211). A triosefosfato-isomerase é uma enzima fundamental na produção de energia, catalisando a reação reversível de isomerização da diidroxiacetona-fosfato a D-gliceraldeído-3-fosfato na via glicolítica (CARUSO *et al.*, 2008; GAO *et al.*, 2011). Em plantas de trigo (*Triticum durum* 'Ofanto'), submetidas ao estresse salino, foi observado aumento na expressão da proteína triosefosfato-isomerase (CARUSO *et al.*, 2008), sendo essa proteína também encontrada em plantas de cajueiro resistentes a *Lasiodiplodia theobromae*

(CIPRIANO, 2014). A proteína β -1,3-glucanase, está comumente associada a enzimas marcadoras de indução à resistência (ALMEIDA *et al.*, 2012) e à defesa de fitopatógenos (GONDIM *et al.*, 2014). Os *spots* correspondentes a essa proteína (61 e 62) aumentaram de intensidade nas folhas das plantas das enxertias BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265, quando submetidas ao estresse salino.

Diversas subunidades da ATP sintase (H^+ -ATPase) (*spots* 11, 92, 94, 95, 123 e 132), enzima associada ao metabolismo energético, foram detectadas como diferenciais (Tabela 1). A ATP sintase está situada na membrana dos tilacóides, sendo uma enzima de fundamental importância para a produção de ATP na presença de um gradiente eletroquímico de prótons transmembrana, o qual é gerado pelos complexos de transporte de elétrons. Similar ao observado neste estudo, a expressão diferencial da ATP sintase têm sido relatada em diferentes espécies vegetais sob estresse salino (CARUSO *et al.*, 2008; RAZAVIZADEH *et al.*, 2009; SWAMI *et al.*, 2011; GUO *et al.*, 2012). Estudos demonstram que o grau com que esta enzima responde ao estresse depende da espécie de planta, bem como do tipo e intensidade do estresse. Em *Vigna unguiculata* e *Glycine max*, foram observadas reduções na expressão das subunidades da ATP sintase quando as plantas foram expostas ao estresse salino (SOBHANIAN *et al.*, 2010; ABREU *et al.*, 2014). Incrementos na expressão de bombas de prótons H^+ -ATPase de membrana plasmática têm sido citados como cruciais nos processos de aclimação ao estresse salino, pois tais enzimas são responsáveis pela geração do gradiente de potencial eletroquímico, essencial para a atividade dos transportadores secundários Na^+/H^+ que promovem a exclusão/compartimentação de íons tóxicos (DU *et al.*, 2010).

Sob condições de salinidade, plantas de cajueiro anão precoce tiveram as expressões de diversas proteínas envolvidas especificamente nas respostas a estresses alteradas. Dentre elas, foram identificadas proteínas de choque térmico (HSP) (*spots* 19, 33, 99, 100, 102, 106, 114, 121, 138 e 149), proteína da família chaperonina de 20 kDa (*spot* 50), proteínas/peptídeos de plastídeos associadas a lipídeos (*spot* 57, 117 e 118), proteína da família de protease abundante em cisteína (senescência foliar precoce) (*spot* 109), quitinase (*spot* 111) e a subunidade α do proteossomo (*spot* 144) (Tabela 1).

Proteínas de choque térmico estão geralmente envolvidas na proteção, reparo e degradação de componentes danosos à célula, especialmente proteínas, durante os estresses abióticos (DOWNS *et al.*, 1999; HAMILTON *et al.*, 2001). A síntese das HSP é aumentada quando proteínas não são corretamente formadas e a quantidade de ATP é limitada

(KABAKOV *et al.*, 1997). As HSP podem manter proteínas associadas em um estado competente, dobradas ou não dobradas e, desse modo podem diminuir as agregações proteicas não nativas, ou então podem marca-las como alvos para a degradação (FEDER *et al.*, 1999; HOEKSTRA *et al.*, 2001). Durante o estresse salino, uma estratégia para a sobrevivência da planta é também evitar proteínas mal dobradas, mantendo-as na conformação funcional e, adicionalmente, prevenindo a agregação de proteínas não nativas (WANG *et al.*, 2003). Estudos sugerem que as HSP também interagem de outras formas nas respostas a estresses, atuando coordenadamente ou sinergicamente para prevenir danos celulares e restabelecer a homeostase celular (WANG *et al.*, 2004). Vários trabalhos já identificaram aumentos na abundância das HSP em resposta ao estresse salino em diversas variedades de plantas tolerantes, como pepino, milho, tomate e *Aster tripolium* L. (GEISLER *et al.*, 2010; DU *et al.*, 2010; ZÖRB *et al.*, 2009; MANAA *et al.*, 2011).

Proteínas associadas ao metabolismo antioxidativo foram induzidas em resposta ao estresse salino. Dentre essas proteínas, podem-se citar às isoformas de peroxirredoxinas (*spots* 12, 133 e 139) e a tiorredoxina M4 (*spot* 2) (Tabela 1). Esses resultados corroboram com diversos estudos proteômicos, que relataram expressão diferencial em proteínas relacionadas ao estresse oxidativo em respostas à diferentes estresses ambientais (HAJHEIDARI *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2014).

Proteínas relacionadas ao metabolismo dos aminoácidos também foram identificadas na espectrometria de massas (Tabela 1). Dentre as proteínas pertencentes a esse grupo estão a desidrogenase 2, dependente de NAD (*spot* 56), a 3-hidroxiisobutiril-CoA-hidrolase (*spots* 73, 75 e 76), a glutamina-sintetase (*spot* 79), a triptofano-sintase, cadeia 1 β (*spot* 90), a metilmalonato-semialdeído-desidrogenase (*spot* 93) e a peptidase, subunidade α (*spot* 213) (Tabela 1). A glutamina-sintetase é uma enzima fundamental em plantas superiores para a assimilação do nitrogênio, convertendo o N inorgânico (amônio) para a forma orgânica (glutamina) e para a síntese de outros aminoácidos fornecendo o N amínico para as transaminases (CREN *et al.*, 1999; IRELAND *et al.*, 1999). Em trigo (*Triticum durum* L.), a comparação entre os proteomas foliares, obtidos a partir de plantas controle e estressadas (100 mM de NaCl) também identificou a enzima da glutamina-sintetase, que está relacionada com a síntese do aminoácido prolina, aminoácido comumente relacionado com a tolerância de plantas a estresses abióticos (CARUSO *et al.*, 2008).

Algumas proteínas do metabolismo secundário foram responsivas aos tratamentos analisados, sendo observadas diferenças em suas expressões. Na tabela 1 são apresentadas

algumas dessas proteínas: a Cafeoil-CoAO-metiltransferase (*spot* 54), a isoflavona-redutase, isoforma X2 (*spot* 65), a enona-oxidoreductase (*spots* 68, 72 e 240), a proteína da família das desidrogenases ligadas ao zinco (*spot* 71), a lactoilglutaciona-liase (*spots* 154 e 175) e a formamidase C869.04, isoforma X3 (*spot* 245).

A análise do proteoma de folhas de cajueiro anão precoce revelou que mecanismos de tolerância e/ou aclimação ao estresse salino podem ser modulados diferencialmente por tratamentos de enxertia. Tal abordagem possibilitou a identificação de proteínas envolvidas em diferentes rotas metabólicas que culminam na ativação de mecanismos que resultam na tolerância/susceptibilidade ao estresse.

5 CONCLUSÕES

- A enxertia de plantas de cajueiro anão precoce utilizando a combinação BRS 265 como enxerto e CCP 06 como porta-enxerto se mostrou uma estratégia eficaz para aumentar a tolerância ao estresse salino em plantas de cajueiro anão precoce.
- A maior tolerância das plantas BRS 265/CCP06 está correlacionada com uma compartimentação preferencial de Na⁺ nos caules, que reduz a exposição dos tecidos fotossintetizantes aos íons tóxicos e mantém as trocas gasosas praticamente inalteradas sob condições de estresse;
- O acúmulo de solutos orgânicos, como carboidratos e prolina, parece não ter desempenhado um papel determinante na tolerância das plantas à salinidade, indicando que o ajustamento osmótico não foi o principal mecanismo de adaptação ao estresse salino observado.
- A auto-enxertia com plantas de cajueiro CCP 06 aumenta a sensibilidade à salinidade por impor um desbalanço na homeostase iônica e afetar negativamente as trocas gasosas;
- Plantas de cajueiro anão precoce parecem não sofrer estresse oxidativo severo sob salinidade de 2,0 e 4,0 dS m⁻¹, como evidenciado pela baixa ativação do sistema enzimático antioxidativo;
- O perfil proteico das folhas de cajueiro foi modulado diferencialmente pelos tratamentos de enxertia e de estresse salino, sendo as maiores alterações nas combinações BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265, plantas que apresentaram as melhores respostas sob salinidade;
- A identificação dos peptídeos por espectrometria de massas revelou proteínas que podem estar envolvidas nos processos de aclimação ao estresse salino, tais como aquelas do metabolismo fotossintético (dentre elas, destacam-se a Rubisco (Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase), a ativase da Rubisco, e a proteína do complexo de evolução do oxigênio, essenciais para a eficiência fotossintética e a adaptação da planta às condições adversas) e as de respostas a estresses, como a proteína de choque térmico de 70 kDa e a peroxirredoxina. Essas proteínas desempenham papéis cruciais na proteção celular contra danos oxidativos e contribuem para a homeostase das plantas sob condições de estresse salino, fortalecendo a tolerância da planta;
- A abordagem metodológica utilizada no presente estudo se mostrou uma estratégia extremamente útil, pois, além de fornecer evidências para elucidação de mecanismos de

tolerância à salinidade, fornece informações valiosas para programas de melhoramento, através da seleção de produtos gênicos para estudos de engenharia genética.

REFERÊNCIAS

- ABOGADALLAH, G.M. Antioxidative defense under salt stress. **Plant Signal & Behavior**, v. 5, n. 4, p. 369–374, 2010.
- 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. 02, p. 105-118, 2008.
- ABREU, C.E.B. Análise fisiológica, bioquímica e proteômica de respostas ao estresse salino em plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. 151p. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- ABREU, C.E.B.; ARAÚJO, G.S.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; COSTA, J.H.; LEITE, H.B.; MORENO, F.B.M.B.; GOMES-FILHO, E. Proteomic analysis of salt stress and recovery in leaves of *Vigna unguiculata* cultivars differing in salt tolerance. **Plant Cell Reports**, v.33, p.1289–306, 2014.
- AGHAEI, K.; EHSANPOUR, A.A.; SHAH, A.H.; KOMATSU, S. Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. **Amino Acids**, v. 36, p. 91-98, 2009.
- ALI, G.M.; KOMATSU, S. Proteomic Analysis of Rice Leaf Sheath during Drought Stress. **Journal of Proteome Research** .v.5, p.396-403, 2006.
- ALMEIDA, H.O.; BARBOSA, M.O.; MARQUES, A.E.; PEREIRA, T.H.A.; MAGALHÃES- JÚNIOR, M.J.; TESSAROLLO, N.G.; GAMES, P.D.; BARROS, E.G.; STOLF-MOREIRA, R.; MARCELINO-GUIMARÃES, F.C.; ABDELNOOR, R.V.; PEREIRA, P.R.G.; BARACAT-PEREIRA, M.C. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesq agropec bras**, Brasília.v.47, n.2, p.163-172, 2012.
- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.
- ALVAREZ-PIZARRO, J.C.; GOMES-FILHO, E.; LACERDA, C.F.; ALENCAR, N.L.M.; PRISCO, J.T. Salt-induced changes on H⁺-ATPase activity, sterol and phospholipid content and lipid peroxidation of root plasma membrane from dwarf- cashew (*Anacardium occidentale* L.) seedlings. **Plant Growth Regulation**, v.59, n.2, p.125-135, 2009.
- AMORIM, A.V.; GOMES-FILHO, E.; BEZERRA M.A.; PRISCO, J.T.; LACERDA, C.F. Respostas fisiológicas de plantas adultas de cajueiro anão precoce à salinidade. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 01, p. 113-121, 2010.
- ARAGÃO, R.M.; SILVA, E.N.; VIEIRA, C.F.; SILVEIRA, J.A.G. High supply of NO₃⁻ mitigates salinity effects through an enhancement in the efficiency of photosystem II and

CO₂ assimilation in *Jatropha curcas* plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.34, n.6, p.2135-2143, 2012.

ARAÚJO, L.F. Desenvolvimento e Trocas gasosas de Plantas de Cajueiro anão precoce sob Irrigação Salina em Neossolo Quartzarênico. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p. 116, 2013.

ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v. 166, p. 3-16, 2004.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206-216, 2007.

AZEVEDO NETO, A.D.; PRISCO, J.T.; ENÉAS-FILHO, J.; LACERDA, C.F.; SILVA, J. V.; COSTA, P.H.A.; GOMES-FILHO, E. Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 31-38, 2004.

AZEVEDO-NETO, A.D.; PEREIRA, P.P.A.; COSTA, D.P.; SANTOS, A.C.C. Fluorescência da clorofila como uma ferramenta possível para seleção de tolerância à salinidade em girassol. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 893-897, 2011.

BACARIN, M.A.; MOSQUIN, P.R. Cinética de emissão de fluorescência das clorofilas de dois genótipos de feijoeiro. **Ciência Agrotécnica**, v. 26, p. 705-710, 2002.

BAGINSKY S. Plant proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. **Mass Spectrom Rev**, v. 28, p. 93–120, 2009.

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.

BARROS, L.M. Avaliação da variabilidade de caracteres agronômicos e isoenzimáticos de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), tipos comum e anão precoce, por meio de análise multivariada. **Tese (Doutorado em Agronomia)** - Universidade de São Paulo, São Paulo, 256 f., 1991.

BARROS, L.M.; PIMENTEL, C.R.M.; CORREA, M.P.F.; MESQUITA, A.L.M. **Recomendações técnicas para a cultura do cajueiro anão precoce**. Fortaleza, EMBRAPA/CNPAT, (EMBRAPA, Circular Técnica, 01), p.65, 1993.

BARROS, L.M.; CRISÓSTOMO, J.R. Melhoramento Genético do Cajueiro. In: ARAÚJO, J.P.P.; SILVA, V.V. **Cajucultura: Modernas Técnicas de Produção**. EMBRAPA/CNPAT, Fortaleza, p.73-96, 1995.

BARROS, L.M.; PAIVA, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V.; ARAÚJO, J.P.P. Cajueiro. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, p. 159-176, 2002.

- BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.89-113, 2008.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.
- BEVILACQUA, C.B.; BORGES C.T.; VENSKE, E.; ALMEIDA A.S.; ZIMMER, P.D. Acúmulo de Fitomassa e Teor de Clorofila em Plântulas de Cultivares de Arroz sob Estresse por Frio. **Scientia Agraria Paranaensis – SAP**, v. 14, n. 4, p. 229-233, 2015.
- BEZERRA, I.L.; GHEYI, H.R.; FERNANDES, P.D.; SANTOS, F.J.S.; GURGEL, M.T.; NOBRE, R.G. Germinação, formação de porta-enxertos e enxertia de cajueiro anão precoce, sob estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.6, n.3, p.420-424, 2002.
- BEZERRA, M.A.; OLIVEIRA, R.A.; LACERDA, C.F.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Fotossíntese de Plantas de Cajueiro-Anão Precoce Submetidas ao Estresse Salino. **Proceedings Interamerican Society For Tropical Horticultural**, Flórida, v. 47, p. 149-152, 2003.
- BEZERRA, M.A.; LACERDA, C.F.; PRISCO, J.T. GOMES-FILHO, E. Crescimento e fotossíntese de plantas jovens de cajueiro anão precoce sob estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, p.90-94, 2005.
- BEZERRA, M.A.; LACERDA, C.F.; GOMES-FILHO, E.; ABREU, C. E. B.; PRISCO, J. T. Physiology of cashew plants grown under adverse conditions. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 04, p. 449-461, 2007.
- BÍBLIA. Edição revisada e atualizada. São Paulo: Paulus, 2012.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 246-254, 1976.
- BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, E. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 1158- 1203, 2000.
- BRUGNOLI, E.; LAUTERI, M. Effects of salinity on stomatal conductance, photosintetic capacity, and carbon isotope discrimination of salt tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C3 non-halophytes. **Plant Physiology**, v. 95, p. 628-635, 1991.
- CARDOSO, J.E.; CAVALCANTI, J.J.V.; CYSNE, A.Q.; SOUSA, T.R.M.; CORRÊA, M.C.M. Interação enxerto e porta-enxerto na incidência da resinose do cajueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol.32, n.3, p. 847-854, 2010.

- CARILLO, P.; MASTRLONARDO, G.; NACCA, F.; PARISI, D.; VERLOTA, A.; FUGGI, A. Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. **Functional Plant Biology**, v. 35, p. 412-426, 2008.
- CARNEIRO, P.T.; FERNANDES, P.D.; GHEYI, H.R.; SOARES, F.A.L. Germinação e crescimento inicial de genótipos de cajueiro anão precoce em condições de salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.6, n.2, p.199-206, 2002.
- CARNEIRO, P.T.; FERNANDES, P.D.; GHEYI, H.R.; SOARES, F.A.L.; VIANA, S.B.A. Salt tolerance of precocious-dwarf cashew rootstocks – physiological and growth indexes. **Scientia Agrícola**, v. 61, p. 9-16, 2004.
- CARUSO, G.; CAVALIERE, C.; GUARINO, C.; GUBBIOTTI, R.; FOGLIA, P.; LAGANÀ, A. Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 381-390, 2008.
- CASTLE, W.S.; BOWMAN, K.D.; GROSSER, J.W.; FUTCH, S.H.; GRAHAM, J.H. Rootstocks for florida citrus. Gainesville: Institute of Food and Agricultural Science - University of Florida, p. 47, 1989.
- CASTRO, A.C.R.; BORDALLO, P.N.; CAVACANTI, J.J.V.; BARROS, L.M. Brazilian cashew germplasm bank. **Acta Horti** 918: 857-861. 2011.
- CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-80, 1975.
- CAVALCANTE, R.A. Avaliação de Combinação Enxerto e Porta-enxerto de Cajueiro Anão Precoce. **Dissertação (Mestrado em agronomia/fitotecnia)**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- CAVALCANTI, J.J.V.; BARROS, L.M.; CRISÓSTOMO, J.R.; ARAÚJO, C.A.T.; FERREIRA, O.S. **Avaliação e seleção de porta-enxertos de cajueiro anão precoce**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p.4, 2000.
- CAVALCANTI, M.L.F.; FERNANDES, P.D.; GHEYI, H.R.; JÚNIOR, G.B. Fisiologia do Cajueiro Anão precoce submetido à estresse hídrico em fases fenológicas. **Revista de Biotecnologia e Ciências da Terra**, v. 8, p.42-53, 2008.
- CHARTZOULAKIS, K.S.; LOUPASSAKI, M.; BERTAKY, M.; ANDROULAKIS, I. Effects of NaCl on growth, ion content and CO₂ assimilation rate of six olive cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 96, p. 235-247, 2002.
- CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J.K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**, v.45, p.437-448, 2005.
- CIPRIANO, A.K.A.L. Proteomic analysis of responsive stem proteins of resistant and susceptible cashew plants after *Lasiodiplodia theobromae* infection. **J. Proteomics**, v.113, p. 90–109, 2014.

- COELHO, D.S.; SIMÕES, W.L.; MENDES, A.M.S.; DANTAS, B.F.; RODRIGUES, J.A.S.; SOUZA, M.A. Germinação e crescimento inicial de variedades de sorgo forrageiro submetidas ao estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, n.1, p.25-30, 2014.
- CRAIG PLETT, D.; MØLLER, I. S. Na⁺ transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, n. 4, p. 612-626, 2010.
- CREN, M.; HIREL, B. Glutamine synthetase in higher plants. Regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. **Plant Cell Physiology**, v.40, p.1187-1193, 1999.
- CRISÓSTOMO, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V.; BARROS, L.M.; ALVES, R.E.; FREITAS, J.G.; OLIVEIRA, J.N. Melhoramento do cajueiro-anão-precoce: avaliação da qualidade do pedúnculo e a heterose dos seus híbridos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 477-480, 2002.
- CROCE, D.M. Características Físico-químicas de Extratos de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* st. Hil) no Estado de Santa Catarina. **Ciência Florestal**, v. 12, n. 2, 2002.
- DANI, V.; SIMON, W.J.; DURANTI, M.; CROY, R.R. Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. **Proteomics**, v.5, p.737-745, 2005.
- DEEBA, F.; PANDEY, A.K.; RANJAN, S.; MISHRA, A.; SINGH, R.; SHARMA, Y.K.; SHIRKE, P.A.; PANDEY, V. Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 53, p. 6-18, 2012.
- DEL RÍO, L.A.; CORPAS, F.J.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; GÓMEZ, M.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p.1255-1272, 2002.
- DEMIRAL, T.; TÜRKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, p. 247-257, 2005.
- DIAS, N.S.; BLANCO, F.F. Efeitos dos sais no solo e na planta. In: Gheyi, R.H.; Dias, N.S.; Lacerda, C.F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCTSal, p.472, 2010.
- DOWNS, C.A.; HECKATHORN R.S.L. The chloroplast small heat-shock protein: evidence for a general role in protecting photosystem II against oxidative stress and photoinhibition. **Journal of Plant Physiology**, v. 155, p. 488–496, 1999.
- DU, C.X.; FAN, H.F.; GUO, S.R.; TEZUKA, T.; LI, J. Proteomic analysis of cucumber seedling roots subjected to salt stress. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1450–1459, 2010.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/topic2.htm>, 2000.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
Management of irrigation-induced salt-affected soils, Disponível em: <
http://www.fao.org/fileadmin/templates/cpesap/C-RESAP_Info_package/Links/Module_4/salinity_brochure_eng.pdf>. 2005.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. ().
Status of the World's Soil Resources. FAO, Rome. Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable Use of Salt-affected Soils. Rome, Italy. Disponível em: <https://www.fao.org/policy-support/tools-and-publications/resources-details/en/c/435200/>. 2015.

FEDER, M.E.; HOFFMAN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 243-282, 1999.

FEIJÃO, A.R.; MARQUES, E.C.; SILVA, J.C.B.; LACERDA, C.F.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Nitrato modula os teores de cloreto e compostos nitrogenados em plantas de milho submetidas à salinidade. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 1, p.10-19, 2013.

FERNANDES, P.D.; GHEYI, H.R.; ANDRADE, E.P.; MEDEIROS, S.S. Biossalinidade e produção agrícola. In: GHEYI, H.R.; DIAS, N.S.; LACERDA, C.F. **Manejo da salinidade na agricultura**. Fortaleza, INCTSal, p. 472, 2010.

FERNANDES, P.D.; BRITO, M.E.B.; GHEYI, H.R.; SOARES-FILHO, W.S.; MELO, A.S.; CARNEIRO, P.T. Crescimento de híbridos e variedades porta-enxerto de citros sob salinidade. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 33, n. 2, p. 259-267, 2011.

FERREIRA, P.A.; GARCIA, G.O.; NEVES, J.C.L.; MIRANDA, G.V.; SANTOS, D.B. Produção relativa do milho e teores folheares de nitrogênio, fósforo, enxofre e cloro em função da salinidade do solo. **Revista Ciência Agronômica**, v.38, n.1, p.7-16, 2007.

FERREIRA-SILVA, S.L. Mecanismos de proteção oxidativa contra estresses isolados e combinados de seca, salinidade e temperatura elevada em cajueiro. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. p. 162, 2008.

FERREIRA-SILVA, S.L.; VOIGT, E.L; VIÉGAS, R.A.; PAIVA, J.R.; SILVEIRA, J.A.G. Influência de porta-enxertos na resistência de mudas de cajueiro ao estresse salino. **Pesq. agropec. bras.**, v.44, n.4, p.361-367, 2009.

FERREIRA-SILVA, S.L.; VOIGT, E.L.; SILVA, E.N.; MAIA, J.M.; FONTENELE, A.V.; SILVEIRA, J.A.G. High temperature positively modulates oxidative protection in salt-stressed cashew plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 74, p. 162-170, 2011.

- FLEXAS, J.; BOTA, J.; LORETO, F.; CORNIC, G.; SHARKEY T. D. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. **Plant Biology**, v.6, n.3, p.269-279, 2004.
- FLOWERS, T.J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 307-319, 2004.
- FROTA, P.C.E.; PARENTE, J.I.G. Clima e fenologia. In: ARAÚJO, J.P.P.; SILVA, V.V. **Cajucultura: modernas técnicas de produção**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, p. 43-54, 1995.
- GAINES, M.T.P.; PARKER, M.B.; GASCHO, G.J. Automated determination of chlorides in soil and plant tissue by sodium nitrate. **Agronomy Journal**, v. 76, p. 371 – 374, 1984.
- GAO, Q.; ZHANG, L. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient vtc 1 mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 138-148, 2008.
- GAO, F., ZHOU, Y., ZHU, W., LI, X., FAN, L., ZHANG, G. Proteomic analysis of cold stress-responsive proteins in *Thellungiella* rosette leaves. **Planta**, v.230, p.1033–1046, 2009.
- GAO, L. Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). **Phytochemistry**, v.72, p.1180–1191, 2011.
- GECHEV, T.S.; VAN BREUSEGEM, F.; STONE, J.M.; DENEV, I.; LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bioessays**, v. 28, n. 11, p. 1091-1101, 2006.
- GEHLOT, H. S.; PUROHIT, A.; SHEKHAWAT, N. S. Metabolic changes and protein patterns associated with adaptation to salinity in *Sesamum indicum* cultivars. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 4, p. 31-39, 2005.
- GEISSLER, N.; HUSSIN, S.; KOYRO, H.W. Elevated atmospheric CO₂ concentration enhances salinity tolerance in *Aster tripolium* L. **Planta**, v. 231, p. 583–594, 2010.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.
- GLYNN, P.; FRASER, C.; GILLIAN, A. Foliar salt tolerance of *Acer* genotypes using chlorophyll fluorescence. **Journal of Arboriculture**, v. 29, p. 61-65, 2003.
- GONÇALVES, C.A.A. Comportamento da cultivar Folha de Figo (*Vitis tabrusca* L.) sobre diferentes porta-enxertos de videira. **Dissertação de mestrado**. Lavras, Universidade Federal de Lavras, p. 45, 1996.

- GONDIM, D.M.; VASCONCELOS, I.M.; MORENO, F.B.; MORENO, F.B.M.B.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; ARAÚJO-FILHO, J.H.; SEGALIN, J.; PINTO, P.M.; CARLINI, C.R.R.S.; CARDOSO, J.E.; OLIVEIRA, J.T.A. 2D-PAGE of Cashew Stem Coupled to LC ESI Q-TOF MS/MS Reveals Abundance of Antioxidant Enzymes and Heat Shock Proteins, Compatible with the Crop Adaptation to the Semi-Arid Conditions of Tropical Countries. *J Anal Bioanal Tech.*;S6 (002):9, 2014.
- GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 149-190, 1980.
- GRENE, R. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. **The Arabidopsis Book**, v. 1, p. 1-20, 2002.
- GUANZIROLI, C.E.; SOUZA, H.M.; JÚNIOR, A.V.; BASCO, C.A. Entraves ao desenvolvimento da cajucultura no nordeste: margens de comercialização ou aumentos de produtividade e de escala. **Revista Extensão Rural**, v. 16, p. 96-122, 2009.
- GUO, G.; GE, P.; MA, C.; LI, X.; LV, D.; WANG, S.; MA, W.; YAN, Y. Comparative proteomic analysis of salt response proteins in seedling roots of two wheat varieties. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 1867-1885, 2012.
- GULZAR, S.; KHAN, M.A.; UNGAR, I.A. Salt tolerance of a coastal salt marsh grass. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.34, p. 2595-2605, 2003.
- GURGEL, M.T.; FERNANDES, P.D.; GHEYI, H.R.; SANTOS, F.J. DE S.; BEZERRA, I.L.; NOBRE, R.G. Estresse salino na germinação e formação de porta-enxerto de aceroleira. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.7, n.1, p.31-36, 2003.
- HAMILTON, E.W.; HECKATHORN, S.A. Mitochondrial Adaptations to NaCl. Complex I Is Protected by Anti-Oxidants and Small Heat Shock Proteins, Whereas Complex II Is Protected by Proline and Betaine. **Plant Physiology**, v. 126, 2001.
- HAJHEIDARI, M.; ABDOLLAHIAN-NOGHABI, M.; ASKARI, H.; HEIDARI, M.; SADEGHIAN, S.Y.; OBER, E.S.; SALEKDEH, G.H. Proteome analysis of sugar beet leaves under. **Proteomics**, v.5, p.950-960, 2005.
- HARE, P.D.; CRESS, W.A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 79-102, 1997.
- HARE, P.D.; CRESS, W.A.; VAN STADEN, J. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 413-434, 1999.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. Propagación de plantas: principios y practicas. México, **Continental**, p. 760, 1990.
- HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.-K.; BOHNERT, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463-499, 2000.

- HENDRY, G.A.F.; PRICE, A.H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, G.A.F.; GRIME J.P. (Eds.) **Methods in comparative plant ecology**. London: Chapman & Hall, p.148-152, 1993.
- HEUER, B. Photosynthetic carbon metabolism of crops under salt stress. In: Pessaraki, M. (ed.). **Handbook of Photosynthesis**. New York: Marcel Dekker, p.887-896. 1997.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley, University of California. 31 (**Circular, 347**), 1950.
- HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends Plant Sci**, v. 6, p.431-438, 2001.
- HUANG, Z.; LONG, X.; WANG, L.; KANG, J.; ZHANG, Z.; ZED, R.; LIU, Z. Growth, photosynthesis and H⁺-ATPase activity in two Jerusalem artichoke varieties under NaCl-induced stress. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 591-596, 2012.
- IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br, 2011.
- IRELAND, R.J.; LEA, P.J. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism. In: Singh BK (ed) Plant amino acids. **Biochemistry and biotechnology**. Dekker, New York, p. 49-109, 1999.
- ISMAIL, A. M., HORIE, T. **Genomic approaches to develop salt-tolerant rice**. *Plant Science*, 177(5), 372-380. 2009.
- JELLOULI, N., JOUIRA, H.B., SKOURI, H., GHORBEL, A., GOURGOURI, A., MLIKI, A. Proteomic analysis of Tunisian grapevine cultivar Razegui under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 471-481, 2008.
- JAMIL, S.; ALI, Q.; IQBAL, M.; JAVED, M.T.; IFTIKHAR, W.; SHAHZAD, F.; PERVEEN, R. Modulations in plant water relations and tissue-specific osmoregulation by foliar-applied ascorbic acid and the induction of salt tolerance in maize plants. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, p. 527-538, 2015.
- KABAKOV, A.E.; GABAI, V.L. Heat Shock Proteins and Cytoprotection: ATP-Deprived Mammalian Cells. **RG Landes Co**, Austin, Texas. 1997.
- KALAJI, H.M.; GOVINDJEE; BOSA, K.; KOSCIELNIAK, J.; ZUK-GOŁASZEWSKA, K. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO₂ assimilation of two Syrian barley landraces. **Environmental and Experimental Botany**, v. 73, p. 64-67, 2011.
- KANG, G.; LI, G.; ZHENG, B.; HAN, Q.; WANG, C.; ZHU, Y.; GUO, T. Proteomic analysis on salicylic acid-induced salt tolerance in common wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, p. 1324-1333, 2012.
- KANT, S.; KANT, P.; LIPS, H.; BARAK, S. Partial substitution of NO₃ - by NH₄ + fertilization increases ammonium assimilating enzyme activities and reduces the

- deleterious effects of salinity on the growth of barley. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 303-311, 2007.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319, 1976.
- KAV, N.N.V.; SRIVASTAVA, S.; GOONEWARDENE, L.; BLADE, S.F. Proteome-level changes in the roots of *Pisum sativum* in response to salinity. **Annals Applied Biology**, v. 145, p. 217-230, 2004.
- KEREPESI, I.; GALIBA, G. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. **Crop Science**, v. 40, p. 482-487, 2000.
- KONISHI, H.; ISHIGURO, K.; KOMATSU, S. A proteomics approach towards understanding blast fungus infection of rice grown under different levels of nitrogen fertilization. **Proteomics**, v.1, p.1162-1171, 2001.
- KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I.T.; RENAUT, J. Plant proteome changes under abiotic stress — Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1301-1322, 2011.
- KUMAR, S.G.; REDDY, A.M.; SUDHAKAR, C. NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. **Plant Science**, v. 165, p. 1245-1251, 2003.
- LACERDA, C.F.; CAMBRAIA, J.; CANO, M.A.O.; RUIZ, H.A. Changes in growth and in solute concentrations in sorghum leaves and roots during salt stress recovery. **Environmental and Experimental Botany**, v. 54, p. 69-76, 2005.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos-SP. Ed. Rima Artigos e Textos, p. 531, 2000.
- LI, W.; ZHANG, C.; LU, Q.; WEN, X.; LU, C. The combined effect of salt stress and heat shock on proteome profiling in Suaeda salsa. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 1743-1752, 2011.
- MAJOUL, T.; CHAHED, K.; ZAMITI, E.; OUELHAZI, L.; GHRIR, R. Analysis by two-dimensional electrophoresis of the effect of salt stress on the polypeptide patterns in roots of a salt-tolerant and a salt-sensitive cultivar of wheat. **Electrophoresis**, v. 21, p. 2562-2565, 2000.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba, SP: **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo**. p.201, 1989.

- MANAA, A.; AHMED, H.B.; VALOT, B.; BOUCHET, J.P.; ASCHI-SMITI, S.; CAUSSE, M.; FAUROBET, M. Salt and genotype impact on plant physiology and root proteome variations in tomato. **J. Exp. Bot.**, v. 62, p. 2797–2813, 2011.
- MARQUES, E.C. Estresse salino e mobilização de reservas cotiledonares durante a germinação e estabelecimento da plântula de cajueiro anão precoce. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** - Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 118 f., 2009.
- MARQUES, E.C.; FREITAS, V.S.; BEZERRA, M.A.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Efeitos do estresse salino na germinação, emergência e estabelecimento da plântula de cajueiro anão precoce. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 4, p. 993-999, 2011.
- MARQUES, E.C.; FREITAS, P.A.F.; ALENCAR, N.L.M.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Increased Na⁺ and Cl⁻ accumulation induced by NaCl salinity inhibits cotyledonary reserve mobilization and alters the source-sink relationship in establishing dwarf cashews seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warsaw, v. 35, n. 7, p. 2171-2182, 2013.
- MATOS, N.N.; TEXEIRA-JUNIOR, A.C.; SILVEIRA, J.A.G. Influência do Porta-enxerto no Comportamento Fisiológico de Mudanças de Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) submetidas a Estresses. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 27-31, 2003.
- MEDEIROS, J.F. Qualidade da água de irrigação e evolução da salinidade nas propriedades assistidas pelo "GAT" nos Estados do RN, PB e CE. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)**. Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, f. 173, 1992.
- MELONI, D.A.; GULOTTA, M.R.; MARTÍNEZ, C.A.; OLIVA, M.A. The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycine betaine accumulation in *Prosopis alba*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 16, p. 39-46, 2004.
- MENG, L.B.; CHEN, Y.B.; LU, T.C.; WANG, Y.F.; QIAN, C.R.; YU, Y.; Ge X.L.; Li, X.H.; Wang, B.C. A systematic proteomic analysis of NaCl-stressed germinating maize seeds. **Mol. Biol. Rep.**, v.41, p.3431–3443, 2014.
- MESQUITA, R. C. M.; PARENTE, J. I. G.; MONTENEGRO, A. A. T.; MELO, F. I. O.; PINHO, J. L. N. de; JUNIOR CAVALCANTI, A. T. Influência de regimes hídricos na fenologia do crescimento de clones e progênies de cajueiro precoce e comum nos primeiros vinte meses. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, n.1, p. 96-103, 2004.
- MESQUITA, R.O. Caracterização fisiológica e análise proteômica diferencial de genótipos de soja submetidos a déficit hídrico. **Dissertação (Mestrado em Fisiologia vegetal)**. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais – Brasil, 2010.
- MESQUITA, R.O.; SOARES, E.D.A.; BARROS, E.G; LOUREIRO, M.E. Method optimization for proteomic analysis of soybean leaf: improvements in identification of new and low-abundance proteins. **Genet. Mol. Biol.**, v.35, p.353–361, 2012.
- MIRANDA, J.R.P.; CARVALHO, J.G.; SANTOS, D.R.; FREIRE, A.L.O.; BERTONI, J.C.; MELO, J.R.M.; CALDAS, A.L. Silício de cloreto de sódio na nutrição mineral e

- produção de matéria seca de plantas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 957-965, 2002.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; BREUSEGEM F.V. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 490-498, 2004.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V.B.; VAND EPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? **Trends in Plant Science**, v. 16, p. 300-309, 2011.
- MUNNS, R.; TERMAAT, A. Whole-plant responses to salinity. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 143-160, 1986.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239-250, 2002.
- MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, v. 167, p. 645-663, 2005.
- MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651-681, 2008.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.
- NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262, 1988.
- NEUMANN, P. M.; VOLKENBURGH, E.; CLELAND, R. E. Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. **Plant Physiology**, v. 88, p. 233-237, 1988.
- NEVES, A.L.R.; LACERDA, C.F.; GUIMARÃES, F.V.A.; HERNANDEZ, F.F.F.; SILVA, F.B.; PRISCO, J.T.; GHEYI, H.R. Acumulação de biomassa e extração de nutrientes por plantas de feijão-de-corda irrigadas com água salina em diferentes estádios de desenvolvimento. **Ciência Rural**, v.39, n.3, p. 758-765, 2009.
- NOBRE, R.G.; FERNANDES, P.D.; GHEYI, H.R.; SANTOS, F.J.S.; BEZERRA, I.L.; GURGEL, M.T. Germinação e formação de mudas enxertadas de gravioleira sob estresse salino. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1365-1371, 2003.
- NOCTOR, G.; DE PAEPE, R.; FOYER, C. H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 3, p. 125-134, 2007.
- NOGUEIRA, R.J.M.C.; MORAES, J.A.P.V.; BURITY, H.A. Curso diário e sazonal das trocas gasosas e do potencial hídrico foliar em aceroleiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (1977. Imprensa), Brasília, v. 35, n. 7, p. 1331-1342, 2000.

- NUNES, J. C.; CAVALCANTE, L. F.; LIMA NETO, A. J.; REBEQUI, A. M.; DINIZ, B. L. M. T.; GHEYI, H. R. Comportamento de mudas de nim à salinidade da água em solo não salino com biofertilizante. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.11, p.1152–1158, 2012.
- OLIVEIRA, V.H.; MONTENEGRO, A.A.T.; CARBAJAL, A.C.R.; MESQUITA, A.L.M.; AQUINO, A.R.L.; FREIRE, F.C.O.; OLIVEIRA, F.N.S.; ARAÚJO FILHO, G.C.; PAIVA, J.R.; PAZ, J.S.; PARENTE, J.I.G.; MOSCA, J.L.; BARROS, L.M.; CRISOSTOMO, L.A.; PESSOA, P.F.A.P.; SILVEIRA, S.S. Cultivo do cajueiro anão precoce. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical** (Sistemas de Produção 1), 2002.
- OLIVEIRA, F.N.S. (ED.). Sistema de produção para manejo do cajueiro comum e recuperação de pomares improdutivos. Fortaleza: EMBRAPA Agroindústria Tropical, (SISTEMAS DE PRODUÇÃO, 2), p.37, 2004.
- OLIVEIRA, D.F. Aspectos Fisiológicos e Bioquímicos de Plantas de dois cultivares de Feijão de Corda Inoculados com *Bradyrhizobium sp.* sob Estresse Salino. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. p.75 , 2013.
- OUERGHY, Z.; RÉMY, R.; OUELHAZI, L.; AYADI, A.; BRULFERT, J. Two-dimensional electrophoresis of soluble leaf proteins, isolated from two wheat species (*Triticum durum* and *Triticum aestivum*) differing in sensitivity towards NaCl. **Electrophoresis**, v. 21, p. 2487-2491, 2000.
- PAIVA, J.R.; CARDOSO, J.E.; BARROS, L.M.; CRISÓSTOMO, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V.; ALENCAR, E.S. BRS 226 ou PLANALTO: novo clone de cajueiro anão precoce para o plantio na Região Semi-Árida do Nordeste. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical** (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, n. 78), p. 4, 2002.
- PAIVA, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V.; CORRÊA, M.C.M.; MELO, D.S. Influência do porta-enxerto no desempenho de clones de cajueiro-anão em cultivo irrigado. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 35, p.220 – 226, 2004.
- PAIVA, J.R.; BARROS, L.M. Clones de cajueiro-obtenção, características e perspectivas. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical** (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 82), p. 26, 2004.
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, 405: p. 837-845, 2000.
- PANG, C.A.; WANG, B. Oxidative Stress and Salt Tolerance in Plants. **Progress in Botany**, v. 69, p. 231 – 246, 2008.
- PARDO, J.M.; QUINTERO, F.J. Plants and sodium ions: keeping company with the enemy. Disponível em: <http://genomebiology.com/2002/3/6/reviews/1017.1.>, 2002.
- PARIDA, A.K.; DAS, A.B.; MITTRA, B. Effects of NaCl stress on the structure, pigment complex composition and photosynthetic activity of mangrove *Bruguiera parviflora* chloroplasts. **Photosynthetica**, v. 41, p. 191-200, 2003.

- 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.
- PATTERSON, S.D.; AEBERSOLD, R.H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature Genetics**, 33: 311-323, 2003.
- PESTANA, M.; DAVID, M.; DE-VARENNE A.; ABADIA, J.; FARIA, E. A. Responses of "Newhall" orange trees to iron deficiency in hydroponics: effects on leaf chlorophyll, photosynthetic efficiency, and root ferric chelate reductase activity. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, p. 1609-1620, 2001.
- PLAUT, Z. Photosynthesis in plant/crops under water and salt stress. In: Mohammad Pessaraki (eds), Handbook of Plant and Crop Physiology. **Handbook of plant and crop physiology**. Arizona: Marcel Dekker, Inc., p. 587-603, 1995.
- PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura**. Fortaleza, INCT Sal, p. 472, 2010.
- QUEIROZ, J.E.; GONÇALVES, A.C.A.; SOUTO, J.S.; FOLEGATTI, M.V. Avaliação e monitoramento da salinidade do solo. In: GHEYI, R.H.; DIAS, N.S.; LACERDA, C.F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: INCT, p. 472, 2010.
- RABILLOUD, T.; ADESSI, C.; GIRAUDEL, A.; LUNARDI, J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 18, p. 307-316, 1997.
- RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. **J Proteomics**, v. 74, p.1829–1841, 2011.
- RAMPITSCH, C.; SRINIVASAN, M. The application of proteomics to plant biology: a review. **Canadian Journal of Botany**, v. 84, p. 883-892, 2006.
- RAZAVIZADEH, R.; EHSANPOUR, A.A.; AHSAN, N.; KOMATSU, S. Proteome analysis of tobacco leaves under salt stress. **Peptides**, v. 30, p. 1651-1659, 2009.
- REIS, M.B.A. Análise Comparativa de Proteínas Expressadas Sob Estresse Hídrico em Palma Forrageira (*Opuntia cochenillifera*). **Dissertação**. Universidade Católica de Brasília. Brasília, 2009.
- RHOADES, J.D.; KANDIAH, A.; MASHALI, A.M. The use saline waters for crop production. Campina Grande: **UFPB**, p.117, 2000.
- RHOADS, D. M.; UMBACH, A.L.; SUBBAIAH, C.; SIEDOW, J.N. Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling. **Plant Physiology**, v. 141, p. 357-366, 2006.
- RIBEIRO, M.R.; FREIRE, F.J.; MONTENEGRO, A.A. Solos halomórficos no Brasil: Ocorrência gênese, classificação, uso e manejo sustentável. In: CURI, N.; MARQUES, J.

- J.; GUILHERME, L.R.G.G.; LIMA, J.M.; LOPES, A.S.; ALVAREZ, V. eds. Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, v. 3. p. 165-208, 2003.
- ROMERO-ARANDA, R.; SORIA, T.; CUARTERO, J. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. **Plant Science**, v. 160, p. 265-272, 2001.
- ROSSETTI, A.G.; AQUINO, A.R.L. Influência do tipo de ramo sobre o crescimento e produção do cajueiro-anão precoce de copa substituída. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, 2002.
- SAIRAM, R. K.; TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, v. 86, p. 407-421, 2004.
- SALEKDEH, G. H.; SIOPONGCO, J.; WADE, L. J.; GHAREYAZIE, B.; BENNETT, J. A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. **Field Crops Research**, v. 76, p. 199-219, 2002.
- SECEX-MDIC - Estudo setorial sobre a castanha de caju. Disponível em: <<http://www.fiec.org.br/cin/principal/estatisticas/documents/castanha2012.pdf>>. Acesso em: 05 jan 2016, 2012.
- SEVERINO, L.S.; CARDOSO, G.D.; VALE, L.S.; SANTOS, J.W. Método para determinação da área foliar da mamoneira. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 8, p. 753-762, 2004.
- SCHULZE, W.X.; USADEL, B. Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. **Annu Rev Plant Biol**, v. 61, p. 491-516, 2010.
- SHANNON, M.C.; GRIEVE, C.M. Tolerance of vegetable crops to salinity. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 5-38, 1999.
- SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v.2012, p.1-26, 2012.
- SHA VALLI KHAN, P.S., HOFFMANN, L., RENAUT, J., HAUSMAN, J.F. Current initiatives in proteomics for the analysis of plant salt tolerance. **Current Science**, v. 93, p. 807-817, 2007.
- SHEN, S.; MATSUBAE, M.; TAKAO, T.; TANAKA, N.; KOMATSU, S. A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. **Journal of Biochemistry**, v. 132, p. 613-620, 2002.
- SHEVCHENKO, A.; SUNYAEV, S.; LOBODA, A.; SHEVCHENKO, A.; BORK, P.; ENS, W.; STANDING, K. Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 1917-1926, 2001.

- SHEVCHENKO, A., TOMAS, H., HAVLIS, J., OLSEN, J.V., MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature**, v.1, p. 2856 - 2860, 2006.
- SHINOZAKI, K.; UEMURA, M.; BARLEY-SERRES, J.; BRAY, E.A.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 2. Ed. Oxford: Wiley Black Well, p. 1051-1100, 2015.
- SILVA, E.N.; SILVEIRA, J.A.G.; RODRIGUES, C.R.F.; VIÉGAS, R.A. Physiological adjustment to salt stress in *Jatropha curcas* is associated with accumulation of salt ions, transport and selectivity of K⁺, osmotic adjustment and K⁺/Na⁺ homeostasis. **Plant Biology**, v. 17, p. 1023-1029, 2015.
- SIMOVA-STOILOVA, L.; DEMIREVSKA, K.; PETROVA, T.; TSENOV, N.; FELLER, U. Antioxidative protection and proteolytic activity in tolerant and sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties subjected to long-term field drought. **Plant Growth Regulation**, v. 58, p. 107-117. 2009.
- SMEETS, K.; OPDENAKKER, K.; REMANS, T.; SANDER, S.V.; BELLEGHEM, F.V.; SEMANE, B.; HOREMANS, N.; GUISEZ, Y. VANGRONSVELD, J.; CUYPERS, A. Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in a multipollution context. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 1982-1992, 2009.
- SOBHANIAN, H.; RAZAVIZADEH, R.; NANJO, Y.; EHSANPOUR, A.A.; JAZIL, F.R.; MOTAMED, N.; KOMATSU, S. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. **Proteome Sci** v. 8, p. 20, 2010.
- SOUSA, A.B.O.; BEZERRA, M.A.; FARIAS, F.C.; LACERDA, C.F. Trocas gasosas de plântulas de cajueiro comum sob estresse salino. In: XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2010, Natal. **XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 2010.
- SOUZA, L.P.; NOBRE, R.G.; SILVA, E.M.; PINHEIRO, F.W.A.; ALMEIDA, L.L.S. Crescimento de porta-enxerto de goiabeira sob águas salinizadas e doses de nitrogênio. **Revista Verde**, v. 10, n.3, p.53 - 60, 2015.
- SUGIHARA, K., HANAGATA, N., DUBINSKY, Z., BABA, S., KARUBE, I. Molecular characterization of cDNA encoding oxygen evolving enhancer protein 1 increased by salt treatment in the mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. **Plant Cell Physiology**, v. 41, p. 1279- 1285, 2000.
- SULE, A.; VANROBAEYS, F.; HAJÓS, G.; VAN BEEUMEN, J.; DEVREESE, B. Proteomic analysis of small heat shock protein isoforms in barley shoots. **Phytochemistry**, v.65, p.1853-1863, 2004.
- SWAMI, A.K.; ALAM, S.I.; SENGUPTA, N.; SARIN, R. Differential proteomic analysis of salt stress response in *Sorghum bicolor* leaves. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 321-328, 2011.

- SZABOLCS, I. Soil salinization. In: Pessaraki, M. (ed.) **Handbook of plant and crop stress**. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 3-11, 1994.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 918, 2013.
- TOMAZ, M.A.; SAKIYAMA, N.S.; DAMATTA, F.M.; MARTINEZ, H.E.P.; CRUZ, C.D.; PEREIRA, A.A. Efeito do Porta-enxerto nas Trocas Gasosas, Área Foliar e Superfície de Raiz de Mudanças de *Coffea arabica* L. **Revista Ceres**, v. 53, n. 305, p. 93-98, 2006.
- USDA-ARS. Research databases. Bibliography on salt tolerance. George E. Brown, Jr. Salinity Lab. US **Dep. Agric. Res. Serv.** Riverside, CA, [HTTP://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8908](http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8908)., 2008.
- VANDERSCHUREN, H.; EZEQUIEL, L.; ZAINUDDIN, I.; GRUISSEM, W. Proteomics of model and crop plant species: Status, current limitations and strategic advances for crop improvement. **Journal of Proteomics**, v. 93, p. 5- 19, 2013.
- VEERANAGAMALLAIAH, G.; JYOTHSNAKUMARI, G.; THIPPESWAMY, M.; CHANDRA, O.B.U.L.; REDDY, P.; SURABHI, G.-K.; SRIRANGANAYAKULU, G.; MAHESH, Y.; RAJASEKHAR, B.; MADHURAREKHA, C.; SUDHAKAR, C. Proteomic analysis of salt stress responses in foxtail millet (*Setaria italica* L. cv. Prasad) seedlings. **Plant Science**, v. 175, p. 631-641, 2008.
- VINCENT, D.; ERGÜL, A.; BOHLMAN, M.C.; TATTERSALL, E.A.R.; TILLET, R.L.; WHEATLEY, M.D.; WOOLSEY, R.; QUILICI, D.R.; JOETS, J.; SCHLAUCH, K.; SCHOOLEY, D.A.; CUSHMAN, J.C.; CRAMER, G.R. Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 1873-1892, 2007.
- WANG, 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, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends Plant Sci**, v. 9, p.244–252, 2004.
- WANG, L.; LIU, X.; LIANG, M.; TAN, F.; LIANG, W.; CHEN, YIYONG.; LIN, Y.; HUANG, L.; XING, J.; CHEN, W. Proteomic analysis of salt-responsive proteins in the leaves of mangrove *Kandelia candel* during short-term stress. **PLoS One.**, v.9, n.1, 2014.
- WESTERMEIER, R.; LOYLAND, S.; ASBURY, R. Proteomics technology. **Journal of Clinical Ligand Assay**, v. 25, p. 1-11, 2002.
- WILLADINO, L.; MARTINS, M.H.B.; CAMARA, T.R.; ANDRADE, A.G.; ALVES, G.A. Resposta de Genótipos de Milho ao Estresse Salino em Condições Hidropônicas **Scientia Agricola**, v.56, n.4, p.1209-1213, 1999.

- WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; WILLIAMS, K.L.; HOCHSTRASSER, D.F. Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis*, v.17, p.830–838, 1996.
- YAMAGUCHI, T.; BLUMWALD, E. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 615-620, 2005.
- YAN, K.; CHEN, P.; SHAO, H.; ZHAO, S.; ZHANG, L.; ZHANG, L.; XU, G.; SUN, J. Responses of photosynthesis and photosystem II to higher temperature and salt stress in sorghum. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.198, p.218-225, 2012.
- YEMM, E.W.; COCKING, E.C. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.
- ZHANG, H., WANG, Y., & WANG, J. **Effects of salinity on photosynthesis and growth of maize seedlings**. *African Journal of Agricultural Research*, 7(11), 1683-1690. 2012.
- ZÖRB, C.; SCHMITT, S.; NEEB, A.; KARL, S.; LINDER, M.; SCHUBERT, S. The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. **Plant Science**, v. 167, p. 91-100, 2004.
- ZÖRB, C.; HERBST, R.; FORREITE, C.; SCHUBERT, S. Short-term effects of salt exposure on the maize chloroplast protein pattern. **Proteomics**, v. 9, p.4209–4220, 2009.
- ZHU, J. K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, vol. 6, p. 66-71, 2001.

ANEXO A - Tabela 1 - Proteínas identificadas de quatro combinações de enxerto/porta-enxerto (CCP 06/CCP06, CCP 06/BRS 265, BRS 265/CCP 06 e BRS 265/BRS 265) de dois clones de cajueiro anão precoce, irrigadas com água destilada e com água com condutividade elétrica de 2,0 e 4,0 dS m⁻¹. Os spots obtidos por eletroforese 2D foram identificados por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF).

Nº spot ^a	Proteína (Espécie)	Nº de acesso (NCBI) ^b	Sequências dos peptídeos (MSMS) ^c	Cobertura da sequência (%) ^d	Score ^e	Processo biológico (localização) ^d	pI/MM (kDa) Teórico ^f	pI/MM (kDa) Experimental ^g
2	Tiorredoxina M4, isoforma X1 [<i>Citrus sinensis</i>]	gi 568820463	MIHPIDELSK VNTDESPSIATR	12	127	Metabolismo antioxidativo (Cloroplasto)	9,54 20437	5,64 15380
3	Proteína 2 de armazenamento de semente, 11S globulina [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717945	ETFQNVFR SLDEQALAESFNVPTEIVR AGENGFEYVTFK AMPLDVLMSYR	10	179	Metabolismo energético/Reserva	8,77 53994	5,40 15705
5	Proteína 2 de armazenamento de semente [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 494360	AFFLAGNPQR AGSEGLEWVSFK SIPEEVLANVFQVSR	9	172	Metabolismo energético/Reserva	6,71 43960	5,09 16293
6	Proteína 2 de armazenamento de semente [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 641200053	AGSEGLEWVSFK SIPEEVLANVFQVSR	6	119	Metabolismo energético/Reserva	6,71 43960	4,79 16176
7	Ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase [<i>Gunnera cordifolia</i>]	gi 18024678	MTPQPGVPPPEAGAAVAAESSTG TWTTVWTDGLTSLDR	8	83	Fotossíntese (Cloroplasto)	5,95 51673	5,67 16260
8	nucleosídeo difosfato quinase 1 [<i>Eucalyptus grandis</i>]	gi 702321373	GLVGEIISR IIGATNPAESAPGTIR	16	134	Metabolismo energético		6,76 16027
9	Proteína 2 de armazenamento de semente [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 641200053	AFFLAGNPQR AGSEGLEWVSFK	5	76	Metabolismo energético/Reserva	6,71 43960	4,70 16479
10	Proteína 2 de armazenamento de semente [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 641200053	DFELLFPPR AGSEGLEWVSFK SIPEEVLANVFQVSR	9	154	Metabolismo energético/Reserva	6,71 43960	4,98 16735
11	ATP sintase, subunidade ε [<i>Citrus sinensis</i>]	gi 114329662	TLNLCVLT PNR IGNNEITILVNDAEK SSDIDPQEAQQTLEIAEANLR QTIEANLALR	42	205	Metabolismo energético (Cloroplasto)	5,41 14767	5,23 17242

Tabela 1 - Continuação

12	Peroxirredoxina [<i>Ricinus communis</i>]	gi 255575353	HLPGFVEK ENLGIKDEVLLSDGNGETK YAILAEDGVVK	17	131	Metabolismo antioxidativo (Citoplasma)	7,63 23944	5,13 17710
14	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	DQFQCAGVAIVR LISEAFNIDESLAR ALPLEVIANAFR	7	208	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	4,82 18400
15	Proteína 2 de armazenamento de semente [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 641200053	DFELLFPPR SIPEEVLANVFQVSR	6	135	Metabolismo energético/Reserva	6,71 43960	5,74 18553
16	Proteína 2 de armazenamento de semente [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 641200053	DFELLFPPR SIPEEVLANVFQVSR	6	127	Metabolismo energético/Reserva	6,71 43960	5,55 18123
17	Proteína 2 de armazenamento de semente [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 641200053	AGSEGLEWVSFK SIPEEVLANVFQVSR	6	70	Metabolismo energético/Reserva	6,71 43960	5,85 17930
18	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	LISEAFNIDESLAR ALPLEVIANAFR	5	131	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	5,01 18761
19	Proteína de choque térmico [<i>Ricinus communis</i>]	gi 255558876	ASMEDGVLTVTPK	9	116	Resposta a estresses	5,34 17505	6,76 17593
20	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	IQSEAGTIESWNPSR LISEAFNIDESLAR ADVYIPEVGR ALPLEVIANAFR	10	207	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	5,79 18799
21	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	DQFQCAGVAIVR ALPLEVIANAFR	4	100	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	5,20 18703
22	Proteína 2 de armazenamento de semente [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 641200053	DFELLFPPR SIPEEVLANVFQVSR	6	116	Metabolismo energético/Reserva	6,71 43960	4,79 18877
23	Proteína 2 de armazenamento de semente [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 641200053	TPLVLVQIIDTGNAANQLDENHR AFFLAGNPQR DFELLFPPR SIPEEVLANVFQVSR	14	235	Metabolismo energético/Reserva	6,71 43960	6,05 18626
24	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	LISEAFNIDESLAR ADVYIPEVGR ALPLEVIANAFR	7	168	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	4,65637 19052

Tabela 1 - Continuação

26	Proteína 2 de armazenamento de semente [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 641200053	SIPEEVLANVFQVSR	3	85	Metabolismo energético/Reserva	6,71 43960	5,68 20017
27	Proteína 2 de armazenamento de semente [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 641200053	SIPEEVLANVFQVSR	3	75	Metabolismo energético/Reserva	6,71 43960	5,49 20492
30	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	GTCNNLFCGLDSR DQFQCAGVAIVR ALPLEVIANAFR	7	154	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	5,49 21183
31	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	DQFQCAGVAIVR LISEAFNIDESLAR ALPLEVIANAFR	7	128	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	5,76 22263
33	Proteína de choque térmico [<i>Mangifera indica</i>]	gi 189014946	DFFSDVDFPSPTR	8	75	Resposta a estresses	5,23 19855	5,028 22181
34	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	IQSEAGTIESWNPSR LISEAFNIDESLAR ALPLEVIANAFR	8	178	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	5,76 22823
35	Complexo de evolução do oxigênio 2-3 [<i>Gossypium arboreum</i>]	gi 728841278	EVEYPGQVLR YEDNFDSTTNVAVMVTPTDKK VDYLLGK	14	103	Fotossíntese (Cloroplasto)	8,84 29153	5,47 22593
36	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase - Subunidade maior [<i>Tupistra grandis</i>]	gi 5725121	DTDILAAFR VTPQPGVPAEEPGAAVAAESSTG TWTTVWTDGLTSLDR	10	314	Fotossíntese (Cloroplasto)	6,14 52499	5,45 23723
38	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase - Subunidade maior [<i>Glyptocarpa camellioides</i>]	gi 18140579	VTPQPGVPPEEAGAAVAAESPIGT WTTVWTDGLTSLDR	8	116	Fotossíntese (Cloroplasto)	6,13 50689	5,19 24365
39	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	IQSEAGTIESWNPSR LISEAFNIDESLAR ADVYIPEVGR ALPLEVIANAFR	10	238	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	5,65 24726
40	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase - Subunidade maior [<i>Dendromecon rigida</i>]	gi 2687475	VTPQPGVPAEEAGPAVAAESSTG TWTTVWTDGLTSLDR	8	70	Fotossíntese (Cloroplasto)	5,95 52015	5,05 24886
42	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase - Subunidade maior [<i>Tupistra grandis</i>]	gi 5725121	DTDILAAFR VTPQPGVPAEEPGAAVAAESSTG TWTTVWTDGLTSLDR YGRPLLGCTIKPK	12	258	Fotossíntese (Cloroplasto)	6,14 52499	6,41 25116

Tabela 1 - Continuação

43	Proteína 2 de armazenamento de semente [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 641200053	SIPEEVLNVFQVSR	11	191	Metabolismo energético/Reserva	6,71 43960	5,36667 25465
44	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	DQFQCAGVAIVR LISEAFNIDESLAR ALPLEVIANAFR	7	181	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	4,85 25607
45	Proteína 2 do complexo de evolução do oxigênio [<i>Glycine max</i>]	gi 356526942	EVEYPGQVLR QAFFGQTDSEGGFDSNAVATANI LESATPVIDGK TADGDEGGKHQLITATVK	23	106	Fotossíntese (Cloroplasto)	8,29 28188	5,85 25279
47	Proteína 2 de armazenamento de semente [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 641200053	DFELLFPPR AGSEGLEWVSFK SIPEEVLNVFQVSR	9	163	Metabolismo energético/Reserva	6,71 43960	5,66 27086
48	Ribose fosfato 3-epimerase [<i>Solanum lycopersicum</i>]	gi 460380509	SDIIVSPSILSANFSK GVNPWIEVDGGVGPCK	10	156	Fotossíntese (Cloroplasto)	7,72 29999	6,22 27782
49	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	DQFQCAGVAIVR LISEAFNIDESLAR ALPLEVIANAFR	7	148	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	4,75 27858
50	Proteína da família chaperonina de 20 kDa [<i>Populus trichocarpa</i>]	gi 224141565	EDDIVGILETDDIK TAGGLLLTEATK	10	140	Resposta a estresses	7,77 27099	6,56 27136
51	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	IQSEAGTIESWNPSR ADVVIPEVGR ALPLEVIANAFR	7	175	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	4,64 27336
52	Actina [<i>Genlisea aurea</i>]	gi 527182282	AVFPSIVGRPR VAPEEHPVLLTEAPLNPK SYELPDGQVITIGNER DLYANTVLSGGTMYPGIADR	22	237	Estrutural	5,26 32448	5,29 28451
53	Triosefosfato isomerase [<i>Cucumis melo</i>]	gi 659082837	LILNESNEFVGDK VIACVGETLEQR VATPAQAQEVHAE LRK	16	196	Metabolismo dos carboidratos (Citoplasma)	5,40 27473	6,63 27685
54	Cafeoil-CoA O-metiltransferase [<i>Broussonetia papyrifera</i>]	gi 47680455	NTMEIGVYTYGSL LATALALPDD GK ILAMDINRENYELGLPVIEK VGGVIGYDNTLWNGSVVAPPDA PLRK	28	141	Metabolismo secundário	27829 5,31	5,36 29371

Tabela 1 - Continuação

55	Ativase da Rubisco [<i>Pinus halepensis</i>]	gi 6967045	VPLILGIWGGK SFQCELVFAK VPIVVTGNDFSTLYAPLIR	17	97	Fotossíntese (Cloroplasto)	8,44 25207	6,48 28055
56	Desidrogenase 2 dependente de NAD [<i>Erythroxylum coca</i>]	gi 392056685	AFDLASKPEGTGTPTK ALFSQITAR	9	109	Metabolismo dos aminoácidos	5,64 27370	6,24 29411
57	Proteína de plastídeos associada a lipídeos [<i>Citrus sinensis</i>]	gi 568826008	EVTEIDNLKK AEIVELITQLEAK VEEISQTIDSENFVQNSIR FEEGHITPQVTDLSLVIPENVEFLG QK	17	145	Resposta a estresses (Cloroplasto)	6,08 43439	4,56 31407
58	Ativase 2 da Rubisco [<i>Pinus massoniana</i>]	gi 589912895	VPIVVTGNDFSTLYAPLIR LVDSFPGQSIDFFGALR	7	123	Fotossíntese (Cloroplasto)	5,89 53085	5,42 29973
59	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	IQSEAGTIESWNPSR DQFQCAGVAIVR LISEAFNIDESLAR ALPLEVIANAFR	10	252	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	5,01 31880
60	Proteína 1 do complexo de evolução do oxigênio [<i>Bruguiera gymnorhiza</i>]	gi 119952178	GTGTANQCPTIEGGVDSFAFKPG K LTYTLDEIEGPFVSPDGTVK FVEKDGIDYAAVTVQLPGGER GGSTGYDNAVALPAGGR	25	357	Fotossíntese (Cloroplasto)	6,48 35344	5,24 33037
61	β -1,3-glucanase [<i>Mangifera indica</i>]	gi 87042321	NGNNLPPQAEVVVTLTK GSNIELILDVPK	15	78	Metabolismo dos carboidratos	5,77 19552	4,82 33709

Tabela 1 - Continuação

62	β -1,3-glucanase [<i>Mangifera indica</i>]	gi 87042321	IYDPDQATLQALR GSNIELILDVPK	13	111	Metabolismo dos carboidratos	5,77 19552	4,68 34152
63	Não encontrado							4,74 34963
64	Não encontrado							4,64 35035
65	Isoflavona redutase, isoforma X2 [<i>Populus euphratica</i>]	gi 743912939	ILFIGGTGYIGK FIVEASVK FFPSEFGNDVDR	9	125	Metabolismo secundário	9,12 36288	5,79 35536
66	Frutoquinase [<i>Manihot esculenta</i>]	gi 756179866	TALAFVTLR DAGALLSYDPNLR LPLWPSPEAR LLLVTLGEK FANACGAITTTK	16	286	Metabolismo dos carboidratos	5,19 35645	5,11 37454
67	Frutoquinase 1 [<i>Eucalyptus grandis</i>]	gi 702236757	TALAFVTLR DAGALLSYDPNLR LPLWPSPEAR FANACGAITTTK	13	178	Metabolismo dos carboidratos	5,24 35914	5,03 36818
68	Enona oxidoreductase [Mangifera <i>indica</i>]	gi 387135418	ATDSPLPTVPGYDVAGVVVK EGDEVYGDINEK EGGAVVALTGAVTPPGFR	13	143	Metabolismo secundário	8,61 40558	5,84 36477
69	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	DQFQCAGVAIVR ALPLEVIANAFR	4	78	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	5,95 37940
70	Ativase 2 da Rubisco [<i>Morus notabilis</i>]	gi 703099276	NFMTLPNIK VPLILGIWGGK SFQCELVFAK VPIVVTGNDFSTLYAPLIR FYWAPTR IVDSFPGQSIDFFGALR	16	325	Fotossíntese (Cloroplasto)	7,57 48142	5,68 39900

Tabela 1 - Continuação

71	Proteína da família das desidrogenases ligada ao zinco [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	gi 15222685	LMGCYVVGSA GSK	3	95	Metabolismo secundário	5,84 39082	5,71 40483
72	Enona oxidoreductase [<i>Mangifera indica</i>]	gi 387135418	EGDEVYGDINEK EGGAVVALTGAVTPPGFR	7	128	Metabolismo secundário	8,61 40558	6,24 41161
73	3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase, isoforma X1 [<i>Prunus mume</i>]	gi 645274972	VFTA EYSLICK SPGGG SVGAYLGLTGK	6	177	Metabolismo dos aminoácidos (Mitocôndria)	6,66 46055	5,64 41255
75	3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase, isoforma X2 [<i>Prunus mume</i>]	gi 645274975	SPGGG SVGAYLGLTGK	3	106	Metabolismo dos aminoácidos (Mitocôndria)	6,35 45709	5,80 41341
76	3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase, isoforma X1 [<i>Prunus mume</i>]	gi 645274972	VFTA EYSLICK SPGGG SVGAYLGLTGK	6	154	Metabolismo dos aminoácidos (Mitocôndria)	6,62 46055	5,69 39460
77	Ativase 2 da Rubisco [<i>Morus notabilis</i>]	gi 703099276	NFMTLPNIK VPLILGIWGGK SFQCELVFAK MGINPIMMSAGELESGNAGEPAK VPIVVTGNDFSTLYAPLIR FYWAPTR IVDSFPGQSIDFFGALR LLEYGNMLVQE QENVKR	25	526	Fotossíntese (Cloroplasto)	7,57 48142	5,10 43006
78	Ativase 1 da Rubisco [<i>Pinus massoniana</i>]	gi 590313795	VPLILGIWGGK SFQCELVFAK MCVLFINDLDAGAGR VPIVVTGNDFSTLYAPLIR LVDSFPGQSIDFFGALR	16	326	Fotossíntese (Cloroplasto)	6,49 48624	5,10 44031
79	Glutamina sintetase [<i>Canavalia lineata</i>]	gi 6578120	LENLLDLDITPYTDK AILNLSLR	5	56	Metabolismo dos aminoácidos	6,28 47670	5,86 43310

Tabela 1 - Continuação

83	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	IQSEAGTIESWNPSRALPALPLEVI ANAFR	5	156	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	5,58 43266
84	Ativase 2 da Rubisco [<i>Pinus massoniana</i>]	gi 589912895	VPLILGIWGGK SFQCELVFAK MCVLFINDLDAGAGR VPIVVTGNDFSTLYAPLIR LVDSFPGQSIDFFGALR	15	257	Fotossíntese (Cloroplasto)	5,89 53085	4,96 45843
85	Ativase 1 da Rubisco [<i>Gossypium hirsutum</i>]	gi 12620881	NYMTLPNIK VPLILGIWGGK SFQCELVFAK MCCLFINDLDAGAGR IGVCTGIFR	12	175	Fotossíntese (Cloroplasto)	5,54 48186	4,93 46789
86	Ativase 1 da Rubisco [<i>Pinus massoniana</i>]	gi 590313795	VPLILGIWGGK SFQCELVFAK MCVLFINDLDAGAGR VPIVVTGNDFSTLYAPLIR LVDSFPGQSIDFFGALR	16	268	Fotossíntese (Cloroplasto)	6,49 48624	5,02 46459
87	Ativase 2 da Rubisco [<i>Morus notabilis</i>]	gi 703099276	NFMTLPNIK VPLILGIWGGK SFQCELVFAK MGINPIMMSAGELESGNAGEPAK VPIVVTGNDFSTLYAPLIR FYWAPTR IVDSFPGQSIDFFGALR LLEYGNMLVQEENVKR	25	490	Fotossíntese (Cloroplasto)	7,57 48142	4,63 48582
88	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	IQSEAGTIESWNPSR ALPLEVIANAFR	5	147	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	5,79 51080
89	Legumina A [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 802717867	IQSEAGTIESWNPSRDQLISEAFN IDESLAR ALPLEVIANAFR	8	217	Metabolismo energético/Reserva	6,38 55122	6,06 49037
90	Triptofano sintase cadeia 1 β , isoforma X2 [<i>Elaeis guineensis</i>]	gi 743857866	FIDIPDEVIDIYK	2	61	Metabolismo dos aminoácidos	6,50 50511	5,99 44814

Tabela 1 - Continuação

92	ATP sintase, subunidade β [<i>Dryas drummondii</i>]	gi 7708280	IAQIIGPVLDAFPPGK MPNIYNALVVK GMEVIDTGAPLSVPVGGATLGR SAPAFIQLDTK LSIFETGIK VVDLLAPYR IGLFGGAGVGK TVLIMELINNAK AHGGVSVFVGGVGER VALVYQGMNEPPGAR VGLTALTMAEYFR MVQAGSEVSALLGR FVQAGSEVSALLGR GIYPAVDPLDSTSTMLQPR	36	812	Metabolismo energético	5,14 52111	5,64 53340
93	Metilmalonato-semialdeído desidrogenase [<i>Cicer arietinum</i>]	gi 502142253	VNAGTEPDADLGPVISK ASFAGDLNFGYK AGVNFYTQIK	7	149	Metabolismo dos aminoácidos (Mitocôndria)	7,08 58125	5,61 53531
94	ATP sintase, subunidade β [<i>Tasmannia insipida</i>]	gi 5031149	VVDLLAPYR KSGVINEENIAESK MSGVINEENIAESK	4	78	Metabolismo energético	5,20 53173	5,87 56232
95	ATP sintase, subunidade β [<i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>]	gi 731341013	VLNTGSPITIPVGR IGLFGGAGVGK TVLIMELINNVAK FTQANSEVSALLGR IPSAVGYQPTLATDLGGLQER QISELGIYPAVDPLDSTSR	16	310	Metabolismo energético (Mitocôndria)	6,01 59500	6,43 55681
96	Não encontrado							4,75 55871
97	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase - Subunidade maior [<i>Eucalyptus grandis</i>]	gi 702272868	NVVLDEFGSPK AIELPDAMENAGAALIR LGLLSVTSGANPVSVKR LIVEFENAR ISAIKDIIPLLEK DIIPLEK APLLIAEDVTGEALATLVVNK VGAATETELEDK	17	517	Fotossíntese (Cloroplasto)	5,16 61384	4,86 62714
98	Não encontrado							6,34 64482

Tabela 1 - Continuação

99	Proteína de choque térmico 70 kDa [<i>Citrus sinensis</i>]	gi 568866888	DVDEVLLVGGMTR VQEVVSEIFGK GVNPDEAVVALGAAIQGGILR EIEDAVADLR	7	254	Resposta a estresses (Mitocôndria)	5,75 73371	5,46 69092
100	Proteína 3 de organização hsp70- Hsp90 [<i>Sesamum indicum</i>]	gi 747068848	VMQALGVLLNLK DYEPAIETFQK	3	81	Resposta a estresses	5,99 66469	6,09 76253
101	Não encontrado							5,99 76482
102	Proteína de choque térmico 70 kDa do estroma [<i>Elaeis guineensis</i>]	gi 743822557	QAVVNPENTFFSVK EFAAEEISAQVLR AVVTVPAYFNDSQR AKFEELCSDLLDR DLDEVILVGGSTR IPAVQELVK	10	382	Resposta a estresses (Cloroplasto)	5,27 75348	4,91 75340
103	Não encontrado							5,27 76024
106	Proteína de choque térmico 17.5 kDa [<i>Populus trichocarpa</i>]	gi 566253754	NVEKEDQNDTWHR ASMENGVLTVTPK	17	103	Resposta a estresses (citoplasma, núcleo)	5,31 18321	6,28 20899
109	Proteína da família de protease abundante em cisteína, Senescência foliar precoce [<i>Populus trichocarpa</i>]	gi 566176391	FNGGLDTEEAYPYTGK	4	75	Resposta a estresses	6,27 39955	4,86 29972
110	Não encontrado							4,61 30534
111	Quitinase [<i>Mangifera indica</i>]	gi 189014948	DGFLNAANSFPQFGSGSADESK SNAYCDQSNTQYPCVPGKK	17	151	Resposta a estresses	5,77 26352	5,82 32192
112	Não encontrado							4,85 31992

Tabela 1 - Continuação

114	Proteína de choque térmico 70 kDa do estroma [<i>Populus euphratica</i>]	gi 743943389	VVGIDLGTTNSAVAAMEGGKPTI VTNAEGQR QAVVNPENTFFSVK QFAAEEISAQVLR AVVTVPAYFNDSQR IAGLEVLR IINEPTAASLAYGFEK DEGIDLLKDK AKMELSSLTQTNISLPFITATADG PK HIETTLTR AKFEELCSDLLDR FEELCSDLLDR LSFKDLDEVILVGGSTR IPAVQELVK LDGIPPAPR FDIDANGILSVTAVDK KQDITITGASTLPSDEVER QDITITGASTLPSDEVER	31	1320	Resposta a estresses (Cloroplasto)	5,20 75373	4,74 72495
115	Proteína hipotética EUGRSUZ_G01602, Provável proteína 3 filamentosa [<i>Eucalyptus grandis</i>]	gi 629098159	VLSMSDELELR	5	63	Estrutural	8,39 21351	4,44 17917
116	Proteína não caracterizada LOC100194029 [<i>Zea mays</i>]	gi 212722290	GKIGGGDDVFVGD KAEQYLADSGLPYTHIR	10	131		9,11 31803	6,22 29756
117	Proteína de plastídeos associada a lipídeos [cultivar híbrida <i>Vitis</i>]	gi 163914197	ALVDSFYGTDR AEIVELITQLEAK NPTAPTEALTLLNGK	16	172	Resposta a estresses (Cloroplasto)	4,85 25875	4,52 31157
118	Proteína de plastídeos associada a lipídeos [cultivar híbrida <i>Vitis</i>]	gi 163914197	AEIVELITQLEAK	5	65	Resposta a estresses (Cloroplasto)	4,85 25875	5,82 44605
119	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase - Subunidade maior [<i>Elaeis guineensis</i>]	gi 743835120	VVNDGVTIAR AIELADPMENAGAALIR TVQGLVEELER APLLIIAEDVTGEALATLVVNK	10	218	Fotossíntese (Cloroplasto)	5,15 61128	4,85 60990

Tabela 1 - Continuação

120	Não encontrado							4,54 27808
121	Proteína de choque térmico 70 kDa do estroma [<i>Eucalyptus grandis</i>]	gi 702388541	VVGIDLGTTNSAVAAMEGGKPTI VTNAEGQR TTPSVVAYTR QAVVNPENTFFSVK IAGLEVLR IVDWIAADFK DLDEVILVGGSTR KQDITITGASTLPSDEVER	16	439	Resposta a estresses (Cloroplasto)	5,50 75931	4,66 73196
122	Ativase 1 da Rubisco [<i>Pinus massoniana</i>]	gi 590313795	VPIVVTGNDFFSTLYAPLIR FYWAPTR LVDSFPGQSIDFFGALR	12	255	Fotossíntese (Cloroplasto)	6,49 48624	4,82 43176
123	ATP sintase, subunidade β [<i>Gerrardina foliosa</i>]	gi 59634743	LSIFETGIK IGLFGGAGVGK TVLIMELINNAIK VGLTALTMAEYFR FVQAGSEVSALLGR	13	232	Metabolismo energético	5,46 49633	4,49 55998
124	Não encontrado							5,94 17118
128	Não encontrado							4,82 30564
129	Não encontrado							4,87 25009
130	Triosefosfato isomerase [<i>Glycine soja</i>]	gi 734417690	IEISAQNSWVGK GPEFATIINSVTSK	8	107	Metabolismo dos carboidratos (Cloroplasto)	6,24 32640	5,47 28163
132	ATP sintase CF1, subunidade α [<i>Acer buergerianum subsp. ningpoense</i>]	gi 573014892	IVNIGTVLQVGDGIAR IAQIPVSEAYLGR LIESPAGHSR SVYEPLQTGLIAIDSMPIGR ASSVAQVVTFQER HTLIYDDLK EAYPGDVVFLHSR TFTEEAELK	21	496	Metabolismo energético (Cloroplasto)	5,28 55525	5,13 54003

Tabela 1 - Continuação

133	Peroxirredoxina [<i>Ricinus communis</i>]	gi 255575353	ENLGIKDEVLLSDGNGEFTK YAILAEDGVVK	14	87	Metabolismo antioxidativo	7,63 23944	4,99 17406
135	Não encontrado							5,50 15476
138	Proteína de choque térmico 17.3 kDa classe I [<i>Glycine max</i>]	gi 351725215	SLIPSFFGGR ASMENGVLTVTVPK	15	83	Resposta a estresses (citoplasma, núcleo)	6,17 17336	5,79 19460
139	Peroxirredoxina 2B [<i>Malus domestica</i>]	gi 657946863	KVILFGVPGAFTPTCSLK VILFGVPGAFTPTCSLK	11	66	Metabolismo antioxidativo	5,23 17550	5,74 19894
141	Não encontrado							5,59 21165
144	Proteossomo subunidade α , tipo 6- A [<i>Camelina sativa</i>]	gi 727518138	LFQVEYAFK TSGITSIGVR YIGLVATGITADAR	13	103	Resposta a estresses	5,75 27343	6,25 28612
145	Não encontrado							4,83108 36267
147	Transaminase mtnE [<i>Ricinus communis</i>]	gi 255562088	SSWDVFSEILEK	2	56	Metabolismo dos aminoácidos	6,95 50909	5,41 41598
148	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase - Subunidade maior isoforma 2 [<i>Theobroma cacao</i>]	gi 590590746	AIELPDAMENAGAALIR LGLLSVTSGANPVSVK ELAETDSVYDTEK	7	208	Fotossíntese (Cloroplasto)	5,04 62125	4,81 53464
149	Proteína de choque térmico 70 kDa do estroma [<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>]	gi 470129443	AVVTVPAYFNDSQR IVDWLAADFK DLDEVILVGGSTR	5	95	Resposta a estresses (Cloroplasto)	5,13 74292	4,68 65622
151	Não encontrado							4,89 91532
153	Proteína 2 de armazenamento de semente [<i>Jatropha curcas</i>]	gi 641200053	TPLVLVQIIDTGNAANQLDENHR AFFLAGNPQR DFELLFPPR SIPEEVLANVFQVSR	14	235	Metabolismo energético/Reserva	6,71 43960	4,82 131905
154	Lactoilglutationa liase (Gloxalase I) [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 359483362	DPDGYIFELIQR GPTPEPLCQVMLR SAEVVNLVTKELGGK QPGPIPLNTK	21	273	Metabolismo secundário (cloroplasto/citoplasma)	5,50 33222	5,51 32146

Tabela 1 - Continuação

			TVLVDNEDFLK					
157	Não encontrado							6,26 72382
161	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase - Subunidade maior [<i>Trichoscypha patens</i>]	gi 482514290	LTYYPDPYITK DTDILAAFR TFEGPPHGIQVER	17	137	Fotossíntese (Cloroplasto)	7,55 20576	5,14 23570
163	Ativase 1 da Rubisco [<i>Pinus massoniana</i>]	gi 590313795	VPIVVTGDNDFSTLYAPLIR LVDSFPGQSIDFFGALR	8	95	Fotossíntese (Cloroplasto)	6,49 48624	4,77 33720
167	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase - Subunidade maior [<i>Eucalyptus grandis</i>]	gi 702272868	AIELPDAMENAGAALIR TNDSAGDGTASVLR LGLLSVTSGANPVSVK GYISPFVFNPEK DIIPLEK VGAATELEDR	14	330	Fotossíntese (Cloroplasto)	5,16 61384	4,79 61245
168	Não encontrado							5,12 75548
171	Precursor da proteína 2 do complexo de evolução do oxigênio 23 kDa [<i>Salicornia veneta</i>]	gi 148535011	EVEYPGQVLR TADGDEGGKHQITATVK	13	79	Fotossíntese (Cloroplasto)	5,94 21601	5,42 24530
172	Triosefosfato isomerase [<i>Gossypium arboreum</i>]	gi 728840677	VAYALSQGLK VIACIGETLEER	10	90	Metabolismo dos carboidratos (Citoplasma)	6,10 23368	6,08 27255
173	Triosefosfato isomerase [<i>Sesamum indicum</i>]	gi 747082372	FFVGGNWK GGAFTGEISVEQLK HIIGEDDQFIGKK IYGGSVNGGNCALAK QEDIDGFLVGGASLK GPEFATIINSVTSK	25	267	Metabolismo dos carboidratos (Cloroplasto)	6,53 34334	5,30 27541
174	Cloroplasto PsbO4 [<i>Nicotiana benthamiana</i>]	gi 384038819	GTGTANQCPTIDGGVESFAFKPG K LTYTLDEIEGPFVSPDGTVK VPFLFTIK GGSTGYDNAVALPAGGR GDEEELEKENVK	24	252	Fotossíntese (Cloroplasto)	5,41 35551	5,02 31881

Tabela 1 - Continuação

175	Lactoilglutaciona liase (Glioalase 1) [<i>Vitis vinifera</i>]	gi 359483362	DPDGYIFELIQR GPTPEPLCQVMLR SAEVVNLVTKELGGK QPGPIPLNTK ITSFLDPDGWK TVLVDNEDFLK	25	337	Metabolismo secundário (cloroplasto/citoplasma)	5,50 33222	5,38 33003
177	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase - Subunidade maior isoforma 1 [<i>Theobroma cacao</i>]	gi 590590742	VVNDGVTIAR LGLLSVTSGANPVSVK GYISPQFVTNPEK ELAETDSVYDTEK	8	172	Fotossíntese (Cloroplasto)	5,06 64075	4,83 62320
180	Proteína 1 Fe-S Rieske do complexo citocromo b6-f [<i>Nicotiana tabacum</i>]	gi 401247	DALGNDVIASEWLK	6	56	Fotossíntese (Cloroplasto)	7,59 24535	5,56 14691
181	Proteína transportadora de elétrons, complexo citocromo b6-f, subunidade Fe-S [<i>Panax ginseng</i>]	gi 89475526	VVFVPWTETDFR	6	68	Fotossíntese (Cloroplasto)	5,76 19928	6,06 19099
184	Proteína hipotética CICLE_v10002135mg, provável ribose-5-fosfato isomerase 3 [<i>Citrus clementina</i>]	gi 567880835	LAMPVEVVQFCWK LEGVVEHGLFLDMATAVIIAGK	12	102	Fotossíntese (Cloroplasto)	6,01 29568	5,08 28180
185	Fosforribuloquinase [<i>Pyrus x bretschneideri</i>]	gi 694396466	LTSVFGGAAEPPK GGNPDSNTLISDTTIVICLDDYHS LDR ANDFDLMEYQVK KPDFDAYIDPQK QYADAVIEVLPTQLIPGDNEGK KLTCSPYGIK LTCSYPGIK FYGEVTQQMLK	26	356	Metabolismo dos carboidratos (Cloroplasto)	6,11 45344	5,39 40808
191	Triosefosfato isomerase [<i>Tarenaya hassleriana</i>]	gi 729468017	AAAYALSEGLGVIACIGEK QEDIDGFLVGGASLK GPEFATIVNSVTSK	15	155	Metabolismo dos carboidratos (Cloroplasto)	6,90 33399	5,46 27826
192	Não encontrado							4,26 14371
195	Não encontrado							5,56 34002

Tabela 1 - Continuação

196	Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase - Subunidade maior [<i>Sanguinaria Canadensis</i>]	gi 132040	EITLGFVDLLR	2	76	Fotossíntese (Cloroplasto)	6,46 48727	6,20 35816
202	Não encontrado							4,41 16567
211	Sedoheptulose-1,7-bifosfatase [<i>Morus notabilis</i>]	gi 703086526	DQVAAAMGIYGPR DVPGTHEFLLLDEGK YTGGMVPDVNQIIVK	10	165	Metabolismo dos carboidratos (Cloroplasto)	5,88 42916	6,08086 47711
212	Fosforribuloquinase [<i>Eucalyptus grandis</i>]	gi 702340240	LTSVFGGAAEPPK GGNPDSNTLISDTTTCVCLDDYHS LDR ANDFDLMYEQVK ILVIEGLHPMFDQR QYADAVIEVLPTQLIPGDNEGK	21	187	Metabolismo dos carboidratos (Cloroplasto)	6,52 45589	5,41 40453
213	Peptidase, subunidade α [<i>Gossypium arboreum</i>]	gi 728850771	EQIGYTFDALK TYVPEMVELLIDCVR SAILMNLRSR	7	197	Metabolismo dos aminoácidos (Mitocôndria)	5,53 54545	5,61 50445
215	Proteína transportadora de elétrons, complexo citocromo b6-f, subunidade Fe-S [<i>Panax ginseng</i>]	gi 89475526	VVFVPWTETDFR	6	67	Fotossíntese (Cloroplasto)	5,76 19928	6,06 19642
218	Ativase da Rubisco [<i>Musa acuminata subsp. malaccensis</i>]	gi 695062479	NFMNLPNIK VPLILGIWGGK SFQCELVFAK VPIIVTGNDFSTLYAPLIR	11	95	Fotossíntese (Cloroplasto)	6,18 47898	4,76 45073
228	Ativase 2 da Rubisco [<i>Pinus massoniana</i>]	gi 589912895	VPLILGIWGGK SFQCELVFAK MCVLFINDLDAGAGR VPIVVTGNDFSTLYAPLIR LVDSFPGQSIDFFGALR	15	206	Fotossíntese (Cloroplasto)	5,89 53085	5,87 35633
229	Não encontrado							4,46 33789

Tabela 1 - Continuação

236	Triosefosfato isomerase [<i>Gossypium arboreum</i>]	gi 728837729	FFVGGNWK VAYALSQGLK VIACIGETLEQR ISNWTDVVLAYEPVWAIGTGK VATPAQAQEVHFEFLR ELAAKPDVDGFLVGGASLKPEFI DIIK	36	176	Metabolismo dos carboidratos (Citoplasma)	6,34 27430	6,46 27119
240	Enona oxidoreductase [<i>Mangifera indica</i>]	gi 387135418	VSVPQVKEDQVLIK ATDSPLTVPGYDVAGVVVK NLDFVQAAGLPLAIETAYEGLER SILVLNGSGGVGSLVIQLAK EGGAVVALTGAVTPPGFR	25	299	Metabolismo secundário	8,61 40615	6,39 36683
245	Formamidase C869.04 isoforma X3 [<i>Tarenaya hassleriana</i>]	gi 729371957	EYLTPMGPTPLHVNPIFEIGPVEPR AVLNAIDYLSK ISGIVDSPNAVATLAIPTAIFDQDI RPK	14	112	Metabolismo secundário	5,67 47633	5,16 42142

Spots das proteínas dos géis 2-D selecionados para análise por LC-ECI-MS/MS, onde os valores de abundância relativa foram iguais ou maiores que 1,4 vezes ($p \leq 0,05$).

^a – O número do *spot* corresponde ao número de identificação dos *spots* dos géis resultantes da eletroforese bidimensional em todos os tratamentos analisados.

^b – Número de acesso no banco de dados (NCBI).

^c – Sequência de peptídeos pareados pela MS/MS.

^d – Percentual de cobertura da sequência peptídica da proteína identificada.

^e - Os valores de escores listados excedem o valor do escore limite, calculado pelo Mascot e, portanto, indicam extensa similaridade com base nas sequências consultadas nos bancos de dados (NCBI).

– pI: ponto isoelétrico e MM: Massa Molecular. ^f – Teórico e ^g – Experimental.

