



**Universidade Federal de Alagoas**  
Instituto de Química e Biotecnologia

***Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia***  
***PPGQB***



**ANÁLISE PROTEÔMICA DE TECIDO FOLIAR DE GENÓTIPOS DE  
CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) SUBMETIDOS AO ESTRESSE  
HÍDRICO**

**LUCIANA DA SILVA VIANA**

**Maceió – 2010**

**LUCIANA DA SILVA VIANA**

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE TECIDO FOLIAR DE GENÓTIPOS DE  
CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) SUBMETIDOS AO ESTRESSE  
HÍDRICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências, área de concentração em Biotecnologia e subárea em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart  
Sant'Ana  
Co-orientador: Dr. Alessandro Riffel

Maceió - 2010

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

- V614a Viana, Luciana da Silva.  
Análise proeônica de tecido foliar de genótipo de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) submetidos ao estresse hídrico / Luciana da Silva Viana. – 2010.  
xvii, 117 f. : il. tabs., graf.
- Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana  
Co-Orientador: Alessandro Riffel.  
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2010.
- Bibliografia: f. 96-117.
1. Cana-de-açúcar. 2. Estresse hídrico. 3. Eletroforese bidimensional. 4. Proteômica. I. Título.

CDU: 543.51



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1384, Fax: (82) 3214-1384  
Email: cpgqb@qui.ufal.br

Membros da Comissão Julgadora de Tese da doutoranda **Luciana da Silva Viana**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 16 de agosto de 2010, às 9h, na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana  
Orientador – PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Alessandro Riffel  
Co-orientador - EMBRAPA-AL

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho  
UFPE

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima  
CECA/UFAL

Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Júnior  
CECA/UFAL

Na juventude, um dia quis ser doutora médica. A vida não facilitou... Fui ser professora. O desejo marcou na porta uma abertura. Tornei-me: **PROFESSORA DOUTORA.**

“Dedico este trabalho a minha filha, **THAYSSA MARIA**, por quem tenho grande amor e profundo carinho, pois ela foi à grande inspiradora deste trabalho. Agradeço a você minha filha por todo amor e paciência os quais me proporciona”.

“Dedico este trabalho a um grande amigo que por força do destino hoje não se encontra mais conosco, mas que foi um grande homem e seu grande sonho era chegar onde estou hoje, ser um doutor, dedico minha tese a você miguxo – **JEFFERSON FRANSCISCO** (*in memorian*)”.

## **AGRADEÇO...**

### **A Deus pela minha existência.**

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao prof. Dr. **Euzébio Goulart** por toda sua disponibilidade em sempre agir como orientador e amigo, simultaneamente. Ofereço todo meu respeito e profunda admiração e agradecer por um dia ter me dado a honra de ser sua aluna.

Ao meu co-orientador e acima de tudo muito amigo, Dr. **Alessandro Riffel** pela incrível oportunidade de trabalhar ao seu lado, agradeço muito sua paciência e carinho em está ao meu lado sempre que eu precisava, o meu muito obrigado.

Aos professores da banca de qualificação professores **Gaus Andrade, Luis Carlos e Eurípides Alves**, obrigado pelas sugestões oferecidas.

Ao professor Dr. **Marcelo Loureiro** pela oportunidade de utilizar o laboratório de Fisiologia Vegetal em Viçosa – MG.

A professora Dra. **Andrea Miyasaka** pela oportunidade de realizar uma etapa dos experimentos em proteômica em seu laboratório de Fisiologia Vegetal, Viçosa – MG.

Aos meus **pais** e meus **irmãos**, por me garantirem que era possível. A minha irmã **Jô**, por compreender a necessidade dos meus dias e por saber exatamente o momento certo pra me socorrer, você foi minha mãe que infelizmente não está mais conosco, obrigada por tudo.

Aos meus amigos **Ana Lucila, Roseane, Edilson e Danielle** pela amizade que permitiu que convivêssemos num ambiente recheado de alegria e descontração e por estarem comigo sempre, por ouvirem minhas reclamações, por tentarem me alegrar (tarefa árdua nas horas mais difíceis que enfrentei

durante todo o doutorado) e me acompanharem na “alienação necessária” e dizer que os “tops” na verdade sempre foram vocês.

**Cristina e Luana**, a duas amigas que estiveram e estão presentes em todos os momentos da minha vida, obrigadas amigas por todas as situações.

As minhas duas amigas maravilhosas que me acompanham desde meus primeiros anos de academia, obrigada mesmo **Deyse** e **Karla**, amo demais vocês.

A meu dois sobrinhos, **Alex** e **Kelly** por toda atenção e carinho que me dispuseram em um momento muito difícil da minha vida, obrigado por tudo.

A professora Dra. **Sônia Salgueiro**, pela imensa colaboração e amizade.

Aos amigos de laboratório, de agora e de antes, **Karlos, Milena, Daniel, Edjane, Roberta, João Gomes, Rose, Beatriz, Claudinha, Mariana, Daniel Lyra, Pedro, Lucio, Mikael, Cristiane, Isis, Thiago, Renata, Inês**, por todas as alegrias e tristezas compartilhadas.

A duas pessoas maravilhosas que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e me fazendo enxergar coisas óbvias, obrigada a vocês, **Cenira** e **Aldy**.

Aos professores do **Instituto de Química e Biotecnologia** pelos ensinamentos.

A secretária da pós-graduação, **Rejane** pela atenção sempre que necessário.

A **CAPES** pelo consentimento da bolsa e a **FAPEAL** pela realização desse projeto.

## RESUMO

O *deficit* hídrico é um dos principais fatores limitantes para o aumento da produtividade da cana-de-açúcar no nordeste brasileiro. Essa situação pode ser agravada, pois, devido às preditas mudanças climáticas globais, estima-se que os episódios de restrição hídrica sejam ainda mais freqüentes, inclusive em outras áreas de cultivo no Brasil. As plantas, quando submetidas ao estresse hídrico, expressam uma série de genes e proteínas específicas como um mecanismo de adaptação a essa condição. Portanto, o estudo da proteômica pode ser uma poderosa ferramenta para a identificação de proteínas e determinação dos mecanismos de resposta e adaptação ao estresse hídrico. O presente estudo teve como objetivo verificar a alteração no proteoma e identificar as proteínas envolvidas, dos genótipos: RB72910 (tolerante ao estresse hídrico) e RB72454 (sensível) de cana-de-açúcar quando submetidos ao estresse hídrico. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, e após dois meses de cultivo (controle), suspendeu-se a rega por 2 dias (estresse) que foi monitorado pela determinação do potencial hídrico ( $\Psi_w$ ). Após esse período, retomou-se a irrigação na capacidade de campo por mais dois dias (Recuperação). Três métodos de extração para preparação de amostras protéicas para eletroforese bidimensional foram testados. O método que apresentou os melhores resultados no número de spots, qualidade e reprodutibilidade dos géis foi o método modificado de extração fenólica. Após a análise do proteoma dos tratamentos (controle, estresse e recuperação) para os dois genótipos, constatou-se a presença de vários spots exclusivos e com diferenças de expressão entre os genótipos sensível e tolerante. Foram detectados 480 *spots* para o genótipo sensível e 352 *spots* para o genótipo tolerante e um total de 80 *spots* foram identificados por espectrometria de massas. Foi possível observar que dentre as proteínas possivelmente envolvidas com o estresse hídrico 24% estavam presentes no genótipo tolerante, enquanto apenas 3% foram observadas no genótipo sensível. A análise dos *spots* identificados via espectrometria de massas demonstrou para a cana-de-açúcar, a presença de proteínas como *Chaperonas*, *Ascorbato peroxidase*, *Superóxido dismutase*, *choque térmico*, *14,3-3-like* e *Isoflavona reductase*, proteínas que têm sido descritas por participar de mecanismos de defesa das plantas contra estresses bióticos e abióticos.

**Palavras-chave:** Cana-de-açúcar, Estresse hídrico, Eletroforese bidimensional, Proteômica.

## ABSTRACT

Hydric deficit is one of the main limiting factors for the sugarcane productivity increase in the Brazilian northeast. The process can be worsened due to the global climatic changes and it is estimated the episodes of hydric restrictions will be much more frequent, including in other cultivation areas in Brazil. When plants are submitted to the hydric stress, there is an induction of a series of genes and specific proteins as an adaptation mechanism to this condition. Therefore, proteome studies can be a powerful tool to identify proteins and find out their mechanisms of response and adaptation to the hydric stress. The present study aimed to evaluate changes in the proteome of the RB72910 (tolerant of the hydric stress) and RB72454 (sensitive) genotypes of sugarcane as well to identify the proteins involved when submitted to hydric stress. To carry out these goals, plants were cultivated in a greenhouse, and after two months of cultivation (control), the irrigation was suspended for 2 days (stress), which was monitored by the hydric potential determination ( $\Psi_w$ ). After this period, the irrigation was restarted for two more days (recovery). For the proteome analysis, three extraction methods to prepare protein samples for two-dimensional electrophoresis were tested. The method that presented the best results on the number of spots, quality and reproducibility of the gels was the adapted method of phenol extraction. Results showed the presence of several exclusive spots with differences in the expression between sensitive and tolerant genotypes. It was detected 480 spots for the sensitive genotype and 352 spots for the tolerant genotype, and a total of 80 spots were identified by mass spectrometry (MS-MALDI-TOF) after the proteome analysis for the control, stress and recovery treatments. It was possible to see between both genotypes that 24% of the proteins identified and related to the stress were present in the tolerant genotype, while just 3% of the proteins associated to the hydric stress were observed in the sensitive genotype. The MS analysis of the identified spots showed the presence of proteins such as chaperona, ascorbato peroxidase, superoxide dismutase, heat shock, 14,3-3-like and isoflavone reductase, which have been described to participate in the plant defense mechanisms against biotic and abiotic stresses.

**Key words:** Sugarcane, Hydric stress, Two-dimensional gel electrophoresis, Proteomics.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas da análise proteômica em plantas, usando a interface eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e espectrometria de massas MS/MS (Adaptado segundo DIAS et al., 2000). 21
- Figura 2.** Temperatura e umidade relativa do ar da casa de vegetação durante as análises fisiológicas dos genótipos de cana-de-açúcar submetidos ao estresse hídrico. 33
- Figura 3.** Cultivares de cana-de-açúcar dos genótipos estudados sob diferentes condições de estresse. 45
- Figura 4.** Potencial hídrico da antemanhã (A) e ao meio dia (B) em folhas de dois genótipos de cana-de-açúcar submetidas aos tratamentos controle (100% de AD), estresse severo (20% de AD) e recuperação (voltando a 100% de AD). 47
- Figura 5.** Gel unidimensional (SDS-PAGE) de extratos protéicos de folhas de cana-de-açúcar: M (padrão de peso molecular – kDa). 1 e 2: método 1; 3 e 4: método 2; e 5 e 6: método 3. 49
- Figura 6.** Avaliação por eletroforese bidimensional da distribuição das proteínas de folhas de cana-de-açúcar em diferentes faixas de pH. Em (A) foi usado um gradiente de pH linear de 3-10 e em (B) gradiente de pH linear de 4-7. 50
- Figura 7.** Separação das proteínas de folhas de cana-de-açúcar. Focalização isoeletrica realizada em gradiente linear de 4-7. A. Método 2 (ácida modificada) e B método 3 (fenólica). 51

- Figura 8.** Gráficos de dispersão de intensidade de “spots” entre as repetições para cada metodologia de extração de proteínas de folhas de cana-de-açúcar. A. Método 2 (ácida modificada). B. Método 3 (fenólica). 52
- Figura 9.** Gráfico de distribuição dos *spots* de acordo com massa molecular relativa (Mr). Azul: extração utilizando método 2 (ácida modificada), Amarelo: extração utilizando método 3 (fenólica). 53
- Figura 10.** Gráfico de distribuição dos *spots* de acordo com o ponto isoeletrico (pI). Azul: extração utilizando método 2 (ácida modificada), Vermelho: extração utilizando método 3 (fenólica). 53
- Figura 11.** Géis bidimensionais de proteínas de folhas de cana-de-açúcar. (A) *spots* detectados utilizando o método 2 (ácida modificada). (B) *spots* detectados utilizando o método 3 (fenólica) mostrando os *spots* similares para os dois métodos de extração. 54
- Figura 12.** Géis bidimensionais de amostras de extratos protéicos totais de folhas de cana-de-açúcar utilizando fitas de faixa de pH 4-7. **A** – Genótipo sensível (RB72454); **B** – Genótipo tolerante (RB72910). Tratamentos: controle, estresse e recuperação. 58
- Figura 13.** Orientação dos vetores representando o alinhamento dos *spots* em relação ao gel referênci 59
- Figura 14.** Géis 2-DE de folhas de cana-de-açúcar dos genótipos contrastantes. Foram selecionados os *spots* diferencialmente expressos ou onde a abundância foi de no mínimo 2 vezes maior ou menor sob o efeito do estresse hídrico utilizando ANOVA ( $p \leq 0,05$ ). A e B – *Spots* em azul (proteínas exclusivas 61

do genótipo sensível nos tratamentos controle e estresse, respectivamente), C e D – Spots em verde (proteínas exclusivas do genótipo tolerante nos tratamentos controle e estresse, respectivamente). Os spots em vermelho correspondem aos spots com diferença na expressão entre os diferentes genótipos e tratamentos.

**Figura 15.** Classificação funcional dos spots analisados, separados por eletroforese bidimensional e sequenciados por MS/MS. A – spots identificados no genótipo tolerante; B – spots identificados no genótipo sensível. 77

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	A complexidade da aclimação aos estresses abióticos (adaptada de Cushman e Bohnert, 2000).	13
<b>Tabela 2.</b>	Quantificação de proteínas usando os diferentes métodos de extração nos tecidos foliares de cana-de-açúcar.	49
<b>Tabela 3.</b>	Proteínas das folhas de cana-de-açúcar separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e identificadas por espectrometria de massas (Maldi-tof MS/MS).	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu$ A – MicroAmpere

$\mu$ g – Micrograma

$\mu$ L – Microlitro

2-D – Eletroforese bidimensional

2D- DIGE – Eletroforese bidimensional diferencial

AD – Água disponível

APS – Persulfato de amônio

BLAST – Ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico

BSA – Albumina de soro bovina

CHAPS – Chloroamidopropyl dimethylammonio propane sulfonate

CHCA – Ácido ciano-4-hidroxicinâmico

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ESI – Ionização por Eletronspray

EST – Expressed Sequence Tags

IEF – Focalização isoeétrica

IPG – Gradientes imobilizados de pH

KDa – kiloDaltons

KVh – kilovolt por hora

m/v – Razão massa/volume

m/z – Razão entre massa e a carga

MALDI – Ionização/desorção a laser assistida por matriz

MM – Massa molecular

mM - miliMolar

mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro

MS – Espectrometria de massas

ng – nanograma

OGMs – Organismos geneticamente modificados

p/v – Concentração em peso/volume

pl – Ponto isoelétrico

PMF – Determinação da impressão digital pela massa de peptídeos

PMSF – Fluoreto de fenilmetanosulfonila

PVPP – Polivinil polipirrolidona

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

TCA – Ácido tricloroacético

TEMED – Tetrametiletilenodiamina

TFA – Ácido trifluoroacético

TOF – *Time-of-flight*

v/v – Concentração em volume/volume

$\Psi_w$  – Potencial hídrico foliar

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS .....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1 A Cana-de-açúcar .....	7
3.1.1. Distribuição e importância econômica .....	7
3.2. Estresse abiótico .....	10
3.2.1. O estresse hídrico.....	14
3.3. Extração de proteínas de tecidos vegetais .....	17
3.4. A separação das proteínas por eletroforese bi-dimensional (2-D).....	21
3.4.1. Primeira dimensão: Focalização isoeletrica (IEF).....	22
3.4.2. Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida.....	23
3.4.3. Eletroforese bidimensional diferencial (2D-DIGE) .....	24
3.4.4. Métodos de detecção de proteínas em géis .....	25
3.4.5. Análise da imagem no gel bidimensional .....	25
3.5. A Proteômica.....	26
3.6. Identificação de proteínas por Espectrometria de Massas .....	27
3.7. Bancos de dados .....	30
4. METODOLOGIA.....	32
4.1 Materiais e Métodos.....	33
4.1.1. Instalação do Experimento .....	33
4.2. Coleta e acondicionamento do material vegetal .....	34
4.3. Determinação do Potencial hídrico foliar .....	35
4.4. Extração de proteínas .....	35
4.4.1. Metodologia 1: Extração em solução de ácido tricloroacético (TCA) ...	35
4.4.2. Metodologia 2: Extração com solução de ácido tricloroacético em acetona .....	36
4.4.3. Metodologia 3: Extração em tampão Fenol/SDS.....	36
4.5. Quantificação de proteínas.....	37
4.6. Análise de proteínas por SDS-PAGE e eletroforese bidimensional (2D) .....	38
4.6.1. Eletroforese unidimensional (1D).....	38
4.6.2. Eletroforese Bidimensional (2D).....	38
4.6.2.1. Primeira dimensão .....	38
4.6.2.2. Reidratação das fitas de gradiente de pH imobilizado .....	38
4.6.2.3. Focalização Isoeletrica.....	39
4.6.2.4. SDS-PAGE .....	39
4.6.2.5. Coloração .....	40
4.6.2.6. Análises dos géis.....	40
4.7. Descoloração dos spots .....	41
4.8. Desidratação dos spots .....	41
4.9. Digestão triptica.....	41
4.10. Extração dos peptídeos .....	42
4.11. Dessalinização das amostras usando ZIP TIP .....	42

4.12. Análise por espectrometria de massas .....	42
4.13. Busca no banco de dados MASCOT .....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
5.1. Determinação do potencial hídrico na folha ( $\Psi_w$ ) .....	45
5.2. Avaliações dos métodos de extração de proteínas .....	48
5.3. Análise proteômica dos genótipos submetidos ao estresse hídrico .....	57
5.4. Identificação das proteínas por espectrometria de massas .....	62
5.5. Classificação funcional de proteínas .....	755
5.5.1. Energia .....	76
5.5.1.1. Fotossíntese .....	766
5.5.1.2. Transporte de elétrons .....	79
5.5.1.3. Metabolismo da glicose .....	800
5.5.2. Metabolismo .....	811
5.5.2.1. Metabolismo dos carboidratos .....	811
5.5.2.2. Biossíntese de aminoácidos .....	844
5.5.2.3. Biossíntese de nucleotídeos .....	844
5.5.3. Processos celulares .....	844
5.5.4. Estrutura .....	911
5.5.5. Homeostase: Redox .....	922
5.6. Considerações finais .....	922
6. CONCLUSÕES .....	965
REFERÊNCIAS .....	987

# 1. INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de alta importância social, econômica e ambiental para o Brasil, que é o maior produtor mundial desta cultura, e se apresenta como o principal país do mundo a implantar, em larga escala, um combustível renovável alternativo ao petróleo. Considerado o país mais competitivo por deter os maiores níveis de produtividade, de rendimento industrial e menores custos de produção, é o maior exportador de açúcar e álcool, exercendo forte influência na determinação dos preços internacionais desses produtos.

Genótipos que diferem em tolerância ao déficit hídrico devem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas na expressão gênica quando submetidos a períodos de seca. Essas considerações reforçam a necessidade de um enfoque sistemático nos estudos de estresse hídrico, com maior ênfase na diferenças genéticas entre os genótipos (CASAGRANDE et al., 2001; NEPOMUCENO et al., 2001).

Os genes induzidos em condições de estresse têm função não somente na produção de importantes proteínas do metabolismo, como também na regulação de genes na tradução de sinal (DERGISI, 2005), e podem ser separados em proteínas que provavelmente funcionam na resposta ao estresse, como aquaporinas, proteínas necessárias para produção de vários osmoprotetores (açúcar, prolina, glicina, betalaina, etc.), proteínas que protegem macromoléculas e membranas, proteínas *late-embriogenesis abundant protein* (LEA), chaperones, proteínas ligadoras de mRNA, proteases, e enzimas de desintoxicação. O segundo grupo contém proteínas envolvidas na regulação da tradução de sinais, expressão gênica (ativação e inativação), como as proteínas cinases, fatores transcricionais, fosfolipases C, proteínas de biossíntese de ácido abscísico (ABA) (DERGISI, 2005; UMEZAWA, 2006). Muitas proteínas sofrem modificações pós-traducionais como remoção de peptídeos sinais, fosforilação, glicosilação, carbamilação, e entre outras são extremamente importantes para atividade e localização sub-celular (KRISHNA e WOLD, 1993; GARAVELLI et al., 2001).

Os recentes avanços na proteômica têm possibilitado o estudo de processos biológicos dinâmicos com a análise sistemática do perfil protéico expresso sob determinada condição em um organismo, e ainda mapeamento de caminhos

metabólicos e a identificação de novos genes alvos que podem ser usados na manipulação genética (PANDEY e MANN, 2000; PATTERSON e AEBERSOLD, 2003).

O sucesso do cultivo da cana-de-açúcar se deve à utilização de cultivares obtidos por meio de melhoramento genético clássico desenvolvido pelos centros de pesquisa e estações experimentais. Este é um processo relativamente demorado, visto que, dentre as espécies cultivadas, a cana-de-açúcar possui um genoma bastante complexo, o que dificulta a aplicação de técnicas convencionais de melhoramento para esta planta (VETORRE et al., 2001). Entretanto, o seqüenciamento do genoma, transcriptoma e/ou proteômica de várias plantas, tais como a cana-de-açúcar, vem facilitando e acelerando a identificação de genes responsáveis por qualidades desejáveis, tornando possível a manipulação subsequente de genes de interesse através de técnicas de genética molecular. Tais avanços possibilitarão, cada vez mais, a obtenção de cultivares resistentes a doenças, mais adaptadas e produtivas, diminuindo as perdas na agricultura, além de permitir o aproveitamento de solos até então não utilizáveis (SACILOTO, 2003).

A maior limitação para o melhoramento genético visando à tolerância ao déficit hídrico em plantas é o conhecimento insuficiente sobre as bases fisiológicas, moleculares e genéticas das respostas das plantas ao déficit. Uma resposta fisiológica específica ao déficit hídrico representa na verdade combinações de eventos moleculares que são ativados ou desativados pela percepção do estresse (BRAY, 1993). Compreender como tais eventos interagem entre si representa um importante passo no desenvolvimento de plantas com maior tolerância à seca. Dessa maneira, o estudo dos mecanismos moleculares assume papel-chave na identificação pontual de genes e de rotas metabólicas envolvidas nas respostas fisiológicas à seca (CASAGRANDE et al., 2001).

Este projeto teve na primeira etapa estudar as proteínas de folhas de cana-de-açúcar em ambientes de estresse hídrico, e será complementado pelas proteínas identificadas nas raízes da cana-de-açúcar. Esses resultados abrem a perspectiva para a identificação de novas proteínas envolvidas na resposta ao estresse hídrico, podendo ser aplicadas como novos alvos para o desenvolvimento de OGMs e marcadores moleculares de tolerância ao estresse hídrico para programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar.

## **2. OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

- ✓ Analisar e identificar proteínas cuja expressão é modificada por deficiência hídrica em cana-de-açúcar.

### **2.2. Objetivos específicos**

- ✓ Desenvolver protocolos para o isolamento de proteínas totais de folhas de cana-de-açúcar em condições de estresse hídrico;
- ✓ Identificar “spots” que representam eventuais diferenças entre os géis gerados pela eletroforese 2-D de proteínas dos tecidos isolados dos genótipos tolerantes e submetidos a estresse hídrico, quando comparadas com genótipos susceptíveis a baixos índices de umidade no solo;
- ✓ Desenvolver metodologias específicas para preparação das amostras destinadas aos experimentos de espectrometria de massa baseadas no peso molecular relativo das proteínas isoladas e seus respectivos pontos isoelétricos (IEF).

# **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 A Cana-de-açúcar

##### 3.1.1. Distribuição e importância econômica

A cana-de-açúcar, uma monocotiledônea alógama e semi-perene, pertence à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*, que abrange várias espécies, porém, as canas atualmente cultivadas, em sua maioria, são híbridas. É originária do Sudeste Asiático, na grande região central da Nova Guiné e Indonésia, própria de climas tropicais e subtropicais. A maioria das cultivares comerciais é originária do cruzamento interespecífico de *Saccharum officinarum* com outras espécies do gênero, tais como *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinnensis*, *S. barberi* e *S. edule* (SACILOTO, 2003).

A cana-de-açúcar é cultivada em áreas tropicais e subtropicais em mais de 90 países e considerada uma das mais importantes espécies vegetais da atualidade, particularmente em função de seu papel como fonte de energia (açúcar, etanol e eletricidade) (FAO, 2010). No Brasil, a cana-de-açúcar foi introduzida como planta ornamental e, posteriormente, em função do seu teor de açúcar, foi utilizada como alimento e como matéria prima para a produção de aguardente. Na atualidade, também é utilizada para a produção de álcool (aditivo para gasolina), de álcool hidratado, de energia elétrica, bem como na alimentação animal. Devido ao seu elevado teor de fibras, ainda apresenta, em termos energéticos, grandes vantagens competitivas na comparação com outras matérias-primas (SEAG, 2008).

A produção de cana-de-açúcar foi em cerca de 664 milhões de toneladas na safra 2009, cerca de 90% do total na principal região produtora do País, a Centro-Sul, e 10% no Nordeste. Inicialmente utilizada quase exclusivamente para a produção de açúcar, nas últimas três décadas a cana se tornou um novo paradigma de energia limpa e renovável. Ela contribui decisivamente para a sustentabilidade do planeta e para a luta contra o aquecimento global, já que hoje é a matéria-prima mais eficiente para a produção de etanol, obtido do caldo da cana, e bioeletricidade, obtida da biomassa formada pelo bagaço (resíduo fibroso gerado após a extração do caldo) e a palha (pontas e folhas) da cana. A produção mundial de cana-de-açúcar

totaliza quase 1,5 bilhões de toneladas e está localizada predominantemente na faixa tropical do planeta, nos países em desenvolvimento da América Latina, África e do Sudeste Asiático. A ampliação da produção, do consumo e principalmente do comércio mundial de etanol, especialmente o produzido a partir da cana-de-açúcar, deve gerar renda e beneficiar os produtores rurais dos países mais pobres. O faturamento anual bruto do setor sucroenergético brasileiro é de cerca de US\$ 23 bilhões, sendo que do total de açúcar produzido, 67% foi exportado, situação inversa à do etanol, que teve apenas 17% do total produzido voltado para a exportação (FAO, 2010).

A produtividade da cana-de-açúcar é regulada por diversos fatores de produção, dentre os quais se destacam: a cultivar, o solo (propriedades químicas, físicas e biológicas), o clima (umidade, temperatura, insolação), as práticas culturais (controle da erosão, plantio, erradicação de plantas invasoras, descompactação do solo), o controle de pragas e doenças, a colheita (maturação, corte, carregamento e transporte), entre outros (ORLANDO FILHO *et al.*, 1994).

Na cana-de-açúcar quatro estágios de desenvolvimento são reconhecidos, denominados de germinação e emergência, perfilhamento e estabelecimento da cultura, desenvolvimento da cultura e maturação. Os dois primeiros estágios são os mais prejudicados pelo déficit hídrico. Nestas ocasiões, a deficiência de água afeta o perfilhamento e a altura final dos colmos diminuindo, conseqüentemente, a produção final de açúcar (SUGIHARTO, 2004). Estes estresses provocam uma variedade de respostas nas plantas, que variam desde a alteração na expressão de genes até mudanças no crescimento, desenvolvimento e na produtividade final. Posteriormente, vias de transdução de sinais são ativadas, transmitindo a informação dentro de células individuais e da planta como um todo (BRAY *et al.*, 2000).

Em ambientes naturais e agricultáveis, as plantas freqüentemente crescem sob condições desfavoráveis, tais como a seca, a salinidade, o resfriamento, o congelamento, a alta temperatura, o alagamento ou a intensa luminosidade. Estas condições são coletivamente chamadas de estresses abióticos e qualquer uma delas pode retardar o crescimento e o desenvolvimento, reduzir a produtividade e, em casos extremos, levar a planta à morte (XIONG *et al.*, 2002).

O crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar, quando cultivada em pleno sol, apresentam variação nas características morfológicas e fisiológicas, pois

os colmos se apresentam mais grossos, mais curtos, as folhas mais largas e verdes, e o perfilhamento mais intenso (CAMARGO, 1968). Porém, com o aumento da temperatura acima de 20°C ocorre o aumento no comprimento, diâmetro e número de internódios, sendo que a faixa ideal para desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar situa-se entre 20 a 35°C (CASAGRANDE, 1991).

Outro fator importante corresponde à disponibilidade de água ao longo do ciclo de desenvolvimento da cultura que segundo Sousa (1976) é fundamental para o crescimento da cultura. Dados obtidos por Inman-Bamber (2004) evidenciam que se ocorrer estresse hídrico durante o desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar, haverá uma restrição dos processos fisiológicos como a divisão celular e a sua alongação, o que causaria danos como a diminuição na taxa de acúmulo de massa seca, na taxa de alongação da cultura e no índice de área foliar.

A área foliar dos cultivares de cana-de-açúcar permite correlacionar os cultivares com seu potencial produtivo, massa seca, quantidade de açúcar ou taxa de assimilação líquida. Pois a folha é a estrutura responsável pela produção da maior parte dos carboidratos essenciais ao crescimento e desenvolvimento dos vegetais (HERMANN E CÂMARA, 1999). As folhas são os órgãos responsáveis por 90% da massa seca acumulada nas plantas, resultante da atividade fotossintética (Benincasa, 1988). Inman-Bamber (2004) cita que as temperaturas elevadas em períodos de estresse hídrico causam a diminuição da área foliar, pois aceleram o processo de senescência das folhas verdes. De acordo com Maule et al. (2001), a disponibilidade de água no solo governa a produção vegetal, sendo que sua falta ou seu excesso afeta de maneira significativa o desenvolvimento da área foliar da cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar vem ampliando suas fronteiras agrícolas por meio do uso de cultivares mais adaptadas aos nichos de produção, desenvolvida por centros de pesquisas e estações experimentais (LANDELL et al., 2004). No entanto, as seleções dessas cultivares geralmente são realizadas através de técnicas do melhoramento genético clássico, baseadas em observações de campo. A demanda por cultivares mais tolerantes a períodos mais severos de seca tem despertado na comunidade científica relevante interesse na investigação dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos utilizados pelas plantas em resposta ao estresse hídrico (BARTELS & SUNKAR, 2005). A habilidade de algumas espécies em ajustar osmoticamente suas células sob condições de estresse hídrico é uma resposta

bioquímica- fisiológica que indica a capacidade destas plantas em tolerar períodos curtos de seca, proporcionando à planta a continuar a expansão celular, favorecendo o crescimento vegetal (BARTELS & SUNKAR, 2005). Estes compostos atuam como osmoprotetores e, em alguns casos, como estabilizadores celulares, entre os quais se destacam a trealose e a prolina livre (NEPOMUCENO et al., 2001).

A trealose é um dissacarídeo não redutor, quimicamente estável que, sob condições de estresse hídrico, interage com os grupos polares das cadeias fosfolipídicas existentes na membrana, substituindo a água que foi removida, mantendo estruturas hidrofílicas da membrana plasmática e, conseqüentemente, a estabilidade celular (PATIST & ZOERB, 2005; ALMEIDA et al., 2007). Por sua vez, a prolina livre é um aminoácido, pois seu grupo amino está ligado a dois átomos de carbono, formando um anel imina, o qual confere características de neutralidade à molécula. Sua principal característica como osmoprotetor deve-se à redução do potencial osmótico da célula, mantendo equilíbrio hídrico entre o vacúolo e o citoplasma (BRAY et al., 2001). Também lhe é atribuída à função de depósito de energia e reserva de carbono e nitrogênio, utilizado no restabelecimento da planta após o estresse (KAVI KISHOR et al., 2005).

Como qualquer outro cultivo agrícola, a cana-de-açúcar tem sua produção diretamente influenciada pelos estresses ambientais. O aumento do aquecimento global tem ocasionado a ampliação dos períodos de seca, influenciando de forma direta na disponibilidade de água do solo em canaviais, reduzindo, significativamente, os rendimentos destas áreas (MAULE et al., 2001).

### **3.2. Estresse abiótico**

Segundo Larcher (2000) e Fancelli (2003), estresse é um conjunto de reações de um organismo a agressões de ordem física, fisiológica, ou de outra natureza, capaz de interferir em um estado normal de equilíbrio, ou seja, na sua homeostase.

O estresse refere-se a um desvio das condições ótimas para a vida e induz mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis a princípio, mas podem se tornar permanentes (LARCHER, 2004). Em condições naturais e agricultáveis, as plantas estão freqüentemente expostas às condições de múltiplos estresses, tais como a seca, a elevada salinidade, a alta

temperatura, as inundações e a intensa luminosidade (CHEN e MURATA, 2002), as quais limitarão seu desenvolvimento e suas chances de sobrevivência. Estes estresses, por sua vez, desempenham um papel importante na determinação de como o solo e o clima limitam a distribuição de espécies vegetais (BRESSAN, 2004).

O estresse pode se manifestar em vários graus de severidade, com duração variável, combinados ou não, de modo contínuo ou alternando com momentos de normalidade. No que concerne às plantas, a intensidade do estresse vai depender do órgão ou do tecido alvo, do estágio de desenvolvimento da planta e do genótipo em questão. Levados em consideração estes fatores, o genótipo pode manifestar resistência ou tolerância, sobrevivendo e, às vezes, até crescendo, mesmo que em menores taxas ou o genótipo pode manifestar suscetibilidade sofrendo redução do crescimento e, dependendo da intensidade do estresse, podendo chegar à morte da planta (CAMBRAIA, 2005).

A resposta ao estresse é iniciada quando a planta reconhece o estresse em nível celular. A partir do reconhecimento do estresse, vias de transdução de sinal são ativadas, as quais, por sua vez, transmitem a informação dentro de células individuais e da planta inteira (BRAY et al., 2002). Mudanças na expressão gênica são fundamentais nas respostas a curto, médio e longo prazo que ocorrem durante o déficit hídrico. No entanto, a expressão de alguns genes durante o estresse pode não garantir necessariamente habilidade da planta em sobreviver ao estresse, ou seja, pode ser simplesmente resultado de estresses secundários e/ou injúrias. Outros genes induzidos podem ter uma função adaptativa, embora a repressão gênica também possa estar ligada ao aumento da tolerância ao estresse (BRAY, 1993; BRAY, 2002; NEPOMUCENO, 2000).

O estado de estresse envolve mecanismos específicos de resistência em todos os níveis funcionais e, em muitos casos, eles são induzidos por ação genética diferenciada, representada pela síntese de proteínas de estresse, isoenzimas especiais e, principalmente, de compostos oriundos do metabolismo secundário das plantas (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Os estresses ambientais podem induzir padrões similares de resposta ou de adaptação nas plantas. Algumas dessas respostas podem ser: a produção de compostos osmorreguladores; alterações no metabolismo de carboidratos; redução no crescimento; alterações nas propriedades das membranas celulares e na arquitetura da parede celular; inibição da fotossíntese; aumento da respiração;

senescência e abscisão foliar; atuação do ácido abscísico (ABA) como um “hormônio de estresse”, entre outras (BRESSAN *et al.*, 2004).

Uma resposta comum a diferentes tipos de estresses abióticos é o acúmulo de solutos compatíveis, os quais, além de atuarem no ajustamento osmótico, protegem as estruturas celulares contra os danos induzidos pela desidratação e oxidação. Por essa razão o nome soluto compatível utilizado algumas vezes para designar estes osmólitos não é o mais apropriado devido estes compostos não serem apenas compatíveis, ou seja, não prejudiciais quando em elevada concentração, mas também protetores. Ademais, a síntese de osmólitos pode ter papéis fisiológicos adicionais (CHEN & MURATA, 2002). Por exemplo, auxiliando no controle redox por consumir equivalentes redutores. Este consumo pode ser particularmente benéfico durante a desidratação devido a este estresse induzir uma perturbação na cadeia de transporte de elétrons e aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir de equivalentes redutores. Os solutos compatíveis que podem ser acumulados diferem dentre as espécies vegetais e podem incluir betaínas e compostos relacionados, açúcares, tais como manitol, sorbitol e trealose e aminoácidos, tais como prolina e hidroxiprolina (CHEN & MURATA, 2002).

Folhas e raízes são os tecidos vegetais mais utilizados para avaliar a resposta da planta a um estresse ambiental. No entanto, o efeito do estresse causado por um fator abiótico na planta pode afetar diversos tecidos ao mesmo tempo e envolver múltiplas respostas, levando a um controle genético complexo da tolerância ao estresse (SALEKDEH e KOMATSU, 2007). Em função disso, tem-se procurado realizar a análise do proteoma de plantas estressadas a partir de experimentos planejados para acessar diferentes tecidos simultaneamente, incluindo caule, perfilho hipocótilo, entre outros.

**Tabela 1.** A complexidade da aclimação aos estresses abióticos (adaptada de Cushman e Bohnert, 2000).

<b>Classe dos compostos/proteínas</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Possível modo de ação</b>
Osmoprotetores	Prolina, glicina, betaína, manitol, sorbitol, sacarose, trealose, frutanas.	Ajustamento osmótico, proteção contra espécies reativas de oxigênio.
Protetores contra espécies reativas de oxigênio	Enzimas (catalase, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, oxidase alternativa, proteína desacopladora mitocondrial); Compostos não-enzimáticos (ascorbato, flavonas, carotenóides, antocianinas).	Detoxificação celular.
Proteínas de estresse	Late embryogenesis abundant (LEA), Aquaporinas.	Estabilização de proteínas, estabilização da membrana celular, redução do estresse hídrico.
Heat shock proteins (HSP)	Várias HSPs presentes em diferentes compartimentos intracelulares	Prevenção do dobramento incorreto de proteínas, modulação traducional.
Transportadores de prótons/íons	Transportadores de K <sup>+</sup> , H <sup>+</sup> /ATPases, Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporters.	Estabelecimento do gradiente de prótons, remoção de íons tóxicos do citoplasma e de organelas.
Proteínas de metabolismo específico	Desaturases de ácidos graxos.	Aumento da fluidez da membrana plasmática.
Componentes da sinalização celular	Histidine kinases, MAP kinases, Ca <sup>2+</sup> - dependent protein kinases.	Transdução de sinais celulares.

Fatores de transcrição	Proteínas pertencentes a várias famílias gênicas (EREBP/AP2, zinc finger, Myb).	Ativação da transcrição gênica.
Reguladores de crescimento	Ácido abscísico, citocininas, brassinoesteróides, poliaminas, etileno, etc.	Alteração do metabolismo e da expressão gênica.

### 3.2.1. O estresse hídrico

O estresse pela baixa disponibilidade hídrica (seca) é um dos principais problemas da agricultura e a habilidade das plantas para resistir a tal estresse é de suma importância para o desenvolvimento do agronegócio de qualquer país (SHAO et al., 2008).

As plantas durante seu ciclo de vida nem sempre encontram condições ambientais onde todos os fatores sejam favoráveis ao seu crescimento e desenvolvimento. Um importante fator ambiental que limita o crescimento é a redução na disponibilidade de água do solo. O estresse hídrico ocorre geralmente, na natureza, de maneira gradual e as plantas tolerantes desenvolveram mecanismos para se adaptarem às condições de baixa disponibilidade de água no solo (FILHO e SERAPHIN, 2001)

O déficit hídrico é um estresse abiótico de grande importância, pois inibe o crescimento e a produtividade das culturas (FLEXAS et al., 2004). As plantas expostas a deficiência hídrica alteram seu metabolismo, por meio da ativação de diferentes mecanismos de resistência, a fim de se adaptarem a esse tipo de estresse. Uma das estratégias de sobrevivência das plantas, em ambientes secos, é o ajustamento osmótico, via acúmulo ou compartimentalização de solutos (ASHRAF e FOOLAD, 2007). O ajustamento osmótico é uma resposta ao estresse hídrico, que beneficia a condutância estomática, a assimilação de CO<sub>2</sub> e a expansão dos tecidos, além de permitir a assimilação da água necessária ao metabolismo celular (SERRAJ e SINCLAIR, 2002). Esse mecanismo envolve, basicamente, dois processos: absorção de íons pelo sistema radicular, seguido pelo acúmulo dentro dos vacúolos, e síntese de solutos orgânicos que são armazenados no citosol. Entre os solutos, osmoticamente compatíveis e mais conhecidos, destacam-se: a prolina, glicina

betaína, proteínas solúveis, açúcares e outros compostos nitrogenados (KOYORO, 2005). Dessa forma, deficiências hídricas iniciais podem afetar sensivelmente o processo germinativo, comprometendo o estabelecimento da cultura. Deficiências posteriores poderão paralisar o crescimento, bem como retardar o desenvolvimento reprodutivo das plantas (FANCELLI e DOURADO NETO, 2000).

O papel da prolina na resposta ao estresse hídrico é amplamente questionado. Em plantas superiores, o acúmulo de prolina pode estar relacionado à síntese “de novo” e à diminuição de seu catabolismo. Porém, a baixa utilização de prolina durante o estresse, em consequência da redução na síntese protéica e do aumento na proteólise, também pode contribuir para seu acúmulo (HARE et al., 1998; SILVEIRA et al., 2003). No entanto, Hien et al. (2003) enfatizaram que toda a controvérsia em torno do papel da prolina pode refletir a predominância de sua ação em outros mecanismos de tolerância, que não o ajustamento osmótico. Em relação ao papel das proteínas solúveis, além do ajustamento osmótico em si, Mansour (2000) relaciona o acúmulo de proteínas solúveis, durante o estresse hídrico, à manutenção de um estoque de nitrogênio para ser reutilizado ao término do estresse. Tais proteínas podem ser sintetizadas “de novo” ou ter a expressão aumentada, em resposta ao estresse.

O efeito do estresse na seca é geralmente entendido como a diminuição do crescimento e fotossíntese no nível da planta inteira que está associado a alterações no metabolismo de carbono e nitrogênio (CORNIC e MASSACCI, 1996). A redução da atividade fotossintética é devida a diversos eventos coordenados, como o fechamento estomático e a diminuição da atividade de enzimas fotossintéticas (CHAVES et al., 2003, LAWLOR e CORNIC, 2002). Ademais, as plantas sob déficit hídrico apresentam uma diminuição do volume celular, um aumento na concentração de solutos e uma progressiva desidratação do protoplasma, sendo que, a primeira e mais sensível resposta ao déficit hídrico é a diminuição da turgescência e, associada a esse evento, a diminuição do processo de crescimento, particularmente, do crescimento em extensão (LARCHER, 2004).

Sendo assim, a desidratação causa mudanças fisiológicas e bioquímicas nas plantas, tais como diminuição nas atividades fotoquímicas, redução da fixação de CO<sub>2</sub>, acúmulo de osmólitos e osmoprotetores e alteração no metabolismo de carboidratos (LIU & BAIRD, 2003). Uma perda acima de 30% de água causa um aumento gradual da taxa de respiração, que poderá exceder a taxa de fotossíntese

desencadeando um processo de inanição na planta, devido ao decréscimo das reservas de carboidratos. Entretanto, em espécies de *Populus* têm verificado um aumento da síntese de sacarose e outros açúcares solúveis, em resposta ao estresse hídrico, assim como acúmulo de proteínas de estresse hídrico e sacarose sintase (PELAH *et al.*, 1997).

Em termos moleculares, o sinal de estresse, uma vez produzido pela célula vegetal, deve ativar uma rota de transdução que envia esta mensagem aos fatores de transcrição, que regulam a expressão dos genes encarregados da resposta ao estresse. A perda do volume e da turgescência celular ou a concentração de solutos altera a conformação de proteínas da parede celular e da membrana plasmática da célula vegetal, ativando rotas de transdução de sinais que dão lugar à expressão de determinados genes, transformando assim o fenômeno físico do déficit hídrico em uma resposta bioquímica (WILLIADINO & CAMARA, 2005).

Davies e Zhang (1991) sugerem que há evidências de sinais químicos das raízes que agem diretamente no comportamento dinâmico dos estômatos em condições de déficit hídrico no solo. Pimentel e Rossiello (1995) afirmaram que um ligeiro ressecamento do solo, mesmo que não afete as relações hídricas da parte aérea, causa um aumento na concentração de ácido abscísico (ABA) no xilema, provavelmente produzido na coifa das raízes, levando ao fechamento estomático e à diminuição da expansão celular. Segundo Zeevaart e Creelman (1988) o déficit hídrico promove uma rápida redistribuição e acumulação do ABA nos tecidos da planta; assim, ocorrendo um aumento na concentração do ABA no apoplasto das células-guarda, reduzindo a condutância estomatal.

O ABA pode influenciar as respostas da planta ao déficit hídrico por regular as características morfofisiológicas das plantas (TUBEROSA *et al.*, 1994). Os experimentos de Lea *et al.* (1995) em plantas de milho cultivadas em campo e em laboratório, demonstraram que a acumulação de ABA originados nas raízes foi responsável pela restrição do desenvolvimento das folhas e pela manutenção do desenvolvimento do sistema radicular. Segundo Davies e Zhang (1991), o ABA pode desempenhar importante papel através de sinais químicos para comunicação das raízes com o dossel vegetativo, em resposta ao secamento do solo.

Situações de estresse hídrico podem estimular a síntese de diversas proteínas de proteção ao estresse, tais como as do grupo LEA (“late abundant embryogenesis”) e as chaperonas, relativas à manutenção da estrutura de outras

proteínas. Todos esses componentes podem também desempenhar a função de proteção dos tecidos vegetais contra danos celulares, como os causados pelo estresse oxidativo (ZHU, 2001).

A capacidade apresentada pelas plantas de terem uma produção satisfatória em áreas sujeitas a déficit hídrico é referida como resistência à seca (TURNER 1997). Dependendo dos mecanismos desenvolvidos para resistirem à seca, as plantas são classificadas em três categorias principais: a) espécies que escapam da seca (rápido desenvolvimento fenológico), b) espécies que toleram a seca com alto potencial hídrico (adiam a desidratação) e c) espécies que toleram a seca com baixo potencial hídrico (toleram a desidratação) (TURNER 1986, 1997).

### **3.3. A Proteômica**

Proteoma é o conjunto de todas as proteínas expressas pelo genoma de um organismo. O proteoma celular é muito complexo, formado por um grande número de proteínas que variam conforme o contexto, momento ou evento metabólico que é submetido o organismo (WASINGER et al., 1995, WILKINS et al., 1995, LOPEZ, 1999).

O estudo em larga escala da expressão gênica de proteínas é conhecido como proteômica. A proteômica envolve o isolamento sistemático, identificação, quantificação e seqüenciamento de proteínas expressas em uma organela, célula ou tecido de um organismo, como também a determinação de seu estado de ativação, interação, alteração e suas propriedades (ANDERSON et al., 2001).

O sinergismo oriundo de tamanha tecnologia faz-se necessário num cenário onde se pretende estudar a função e comportamento dos genes com base nas identificações das proteínas por eles codificadas e expressas. Neste contexto, muitas vezes é necessário não somente determinar o conjunto de proteínas presentes em uma amostra e seus níveis, o que por si só apresenta um alto grau de dificuldade, mas também caracterizar as inúmeras isoformas presentes nas proteínas, que são produtos de modificações pós-traducionais sofridas pelas mesmas, e por fim, como essas proteínas interagem entre si. Tais estudos são vistos como bastantes difíceis devido ao alto grau de complexidade das amostras bem

como às baixíssimas concentrações de determinadas proteínas, o que requer uso de técnicas analíticas extremamente sensíveis (TYERS e MANN, 2003).

O recente desenvolvimento de tecnologias aplicadas na biologia tem gerado grande produção de informações na área de genômica de plantas, através do seqüenciamento de diferentes organismos, gerando dados que permitiram a identificação de prováveis novos genes (VIEIRA et al., 2006). Entretanto, é impossível estudar o comportamento dos sistemas biológicos enfocando exclusivamente o genoma, pois são as proteínas e não os genes que determinam o fenótipo de um organismo (PEREIRA et al., 2005). O nível de proteína celular é resultante dos processos pós-transcricionais e pós-traducionais que modulam a quantidade, localização e atividade de seus produtos finais nas células. Estas informações podem assim ser incluídas à anotação do gene correspondente (BAGINSKY e GRUISSEM, 2006). Desse modo, dados proteômicos podem ser usados para melhorar anotações genômicas (DESIERE et al., 2004), pois permitem validar ESTs ('Expressed sequence tags') através de comparação da proteína expressa com o transcrito do gene correspondente (VIEIRA et al., 2006). A proteômica nos fornece dados sobre os atores reais na célula e, portanto, também está numa posição única para integrar os dados de toda a genômica funcional em uma imagem coerente da função celular (GÖRG et al., 2004).

Embora a identificação de todas as proteínas codificadas no genoma de um organismo pareça uma tarefa bastante difícil de realizar, mesmo em organismos simples, são cada vez mais completas as informações obtidas através de estudos proteômicos (SURESH et al., 2005). Esses novos conhecimentos estão relacionados às vias de sinalização celular, conjuntos de proteínas reguladoras, bem como outras informações cruciais sobre os estados fisiológicos e fisiopatológicos de células e organismos (ROCHA et al., 2005).

A proteômica está se tornando uma das mais promissoras áreas da pesquisa, conduzida por grandes avanços da tecnologia e cada vez mais sofisticadas aplicações para quase todas as áreas da biologia, biomedicina e as agrárias (GÖRG et al., 2004). Diversas pesquisas vêm sendo realizadas nesse sentido, como por exemplo, análise da resposta de plantas a estresses ambientais (BAE et al., 2003; DANI et al., 2005).

A proteômica tem como objetivo estudar as propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, suas funções, modificações pós-traducionais, interações entre

proteínas e mecanismos regulatórios (BACKSTOCK e WEIR, 1999). Uma descrição completa do proteoma de um organismo fornece, não apenas um catálogo do conjunto de proteínas que está sendo expresso pelo genoma, mas também dados de expressão celular sob condições definidas e a distribuição dessas proteínas na célula (CASH, 1998). Portanto, o passo do genoma para o proteoma é um passo do nível da informação genética para a função celular. As concentrações de proteínas que são alteradas em determinadas condições fisiológicas mostram quais funções sofrem modificações (JUNGBLUT, 2001).

Através da construção de mapas celulares ou proteomas estruturais, diferentes laboratórios têm realizado análises comparativas entre indivíduos identificando proteínas com acúmulo diferencial, induzidas ou suprimidas, sob diferentes condições, obtendo uma nova visão e compreensão sobre as questões como expressão e regulação gênica das proteínas (GUERREIRO et al., 1997, WILJK, 2001). As proteínas detectadas nesses mapas podem ter suas supostas identidades definidas por seqüenciamento pela espectrometria de massas combinada com ferramentas como a bioinformática (LOPEZ, 1999, NATERA et al., 2000).

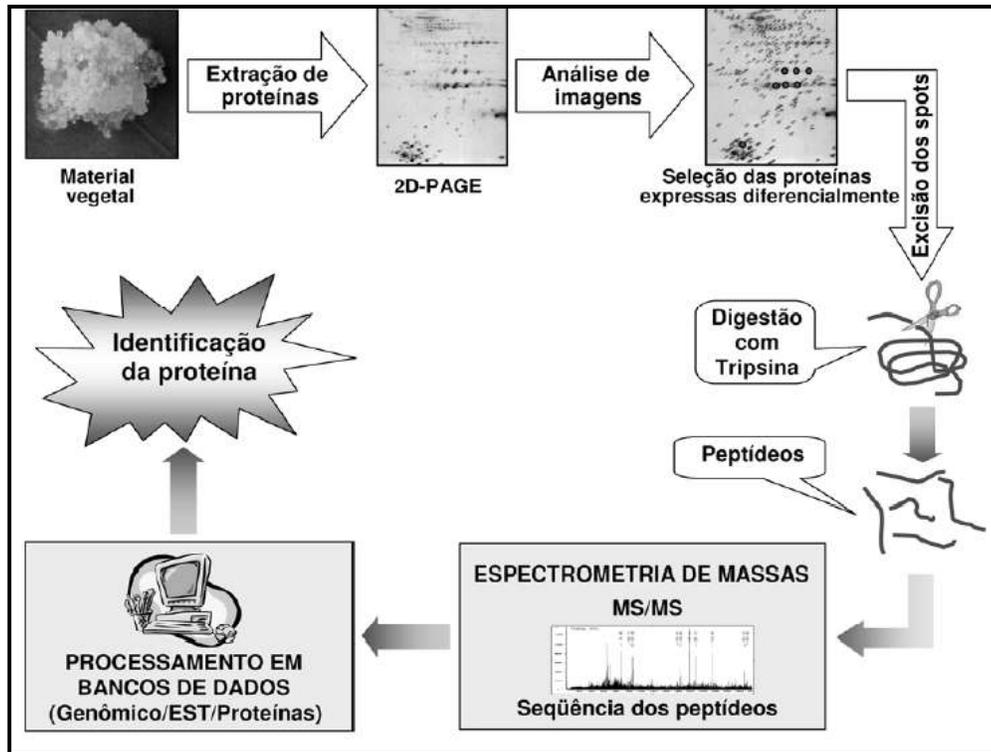
Os estudos proteômicos em plantas foram iniciados com milho (TOUZET et al., 1996) e *Arabidopsis thaliana* (SHANOUN et al., 2000). De acordo com os trabalhos iniciais, as análises proteômicas em plantas foram divididas em duas categorias: 1) estudo do proteoma específico de determinados órgãos ou tecidos e conseqüente elaboração de mapas proteômicos de referência e; 2) análise proteômica comparativa de diferentes proteomas (ROSE et al., 2004). Este último ainda pode ser dividido de acordo com o objetivo do estudo em: 1) avaliação entre diferentes genótipos; 2) avaliação da influência da aplicação de sinais no metabolismo vegetal, por exemplo, a adição ou supressão de reguladores de crescimento e; 3) comparação entre diferentes tecidos e/ou estádios de desenvolvimento vegetal (DIAS, 2000).

Nas plantas a identificação de várias proteínas por espectrometria de massas realizada em arroz (KOLLER et al., 2002), *Arabidopsis* (SANTONI et al., 1998; GALLARDO et al., 2002), milho (TOUZET et al., 1996) e *Medicago truncatula* (WATSON et al., 2003), etc. Koller et al. (2002) identificaram um total de 2.528 proteínas de diferentes tecidos da planta de arroz, sendo 1.022 proteínas em folhas, 1.350 nas raízes e 877 diferentes proteínas nas sementes. A maioria das proteínas

identificadas (67,2%) possui funções ou sequências homólogas de outras proteínas com funções conhecidas nos bancos de dados. Tais proteínas foram classificadas em 16 categorias funcionais, das proteínas identificadas um total de 20,8% estavam envolvidas nos processos metabólicos, como por exemplo, a síntese protéica, na degradação e tradução de sinais. Algumas proteínas envolvidas no processo das vias metabólicas foram encontradas em todos os tecidos da planta, já outras apresentaram um padrão de expressão tecido-específico.

Um dos métodos mais utilizados em proteômica inclui a eletroforese bidimensional e espectrometria de massas que é utilizada para quantificar e identificar proteínas e essas técnicas possibilitaram um aumento na capacidade de resolução das sequências peptídicas (BLACKSTOCK et al., 1999).

Um dos principais objetivos da proteômica são a identificação em larga escala de diferentes proteínas encontradas em uma célula, tecido ou organismo. As técnicas de identificação de proteínas são baseadas em análises de MALDI-TOF-MS e HPLC ESI-MS/MS. A técnica que utiliza espectrômetros de massa tem sido o método mais utilizado em proteômica de plantas para a identificação de proteínas envolvidas em diferentes estresses abióticos (SARAVAN e ROSE, 2004) (Figura 1).



**Figura 1:** Etapas da análise proteômica em plantas, usando a interface eletroforese bidimensional (2D-PAGE) e espectrometria de massas MS/MS (Adaptado segundo DIAS et al., 2000).

### 3.4. A separação das proteínas por eletroforese bi-dimensional (2-D)

A identificação rápida e genérica de proteínas requer um método eficiente para relacionar informações no nível de proteínas com informações no nível do genoma (TYERS e MANN, 2003). Em contraste à análise clássica de proteínas, na qual se analisam proteínas individualmente, a análise proteômica tem uma vantagem única, em que o estado fisiológico pode ser obtido independentemente da atividade biológica da proteína individual, pois é identificado um conjunto de proteínas que podem ser correlacionadas com vias metabólicas (TYERS e MANN, 2003). Para a análise do proteoma, dois princípios são utilizados: o de separação e o de identificação. As duas técnicas de separação mais utilizadas são a eletroforese bidimensional e a cromatografia multidimensional. Na eletroforese bidimensional, as proteínas são separadas por focalização isoelétrica (IEF) e, posteriormente, por massa molecular (SDS-PAGE). Essa estratégia possibilita resolução para separar

proteínas de um extrato protéico complexo (JOUBERT et al., 2000). Na cromatografia multidimensional, as proteínas são separadas pela utilização de cromatografia em várias colunas, com princípios de separação distintos, geralmente empregando-se a cromatografia em colunas de troca iônica e fase reversa (MAYNARD et al., 2004).

A eletroforese bidimensional é o modo direto para mapear o proteoma de um organismo (LOPEZ, 1999; CAHILL *et al.*, 2001). Um importante aspecto do 2D-PAGE é o uso de gradientes imóveis de pH (IPG's - *Immobilises pH Gradients*), onde um gradiente de pH é fixado em uma matriz de poliacrilamida. IPG também possibilita a produção de géis que cobrem diversas faixas de pH, tornando assim mais específica a análise das proteínas ou grupos de proteínas (LANGEN et al., 2000, HOVING et al., 2002).

#### **3.4.1. Primeira dimensão: Focalização isoeétrica (IEF)**

O ponto isoeétrico (pI) de uma proteína corresponde ao valor de pH no qual o somatório de todas as suas cargas parciais é igual a zero. Esta propriedade depende da força iônica, da natureza do tampão utilizado e qualquer outro soluto presente no meio, mas depende também da concentração de proteína. Na focalização isoeétrica as proteínas são separadas eletroforicamente de acordo com a diferença de seus pontos isoeétricos. Uma vez submetidas a um campo elétrico, as proteínas migrarão até encontrar a faixa de pH referente ao seu pI onde ficarão com carga total neutra, interrompendo a migração no gel (PANDEY e MANN, 2000).

A quantidade de proteína que pode ser utilizada para se obter uma ótima resolução, o máximo de spots e o mínimo de arraste nos géis depende do gradiente de pH utilizado, da distância de separação e da complexidade das proteínas na amostra (GÖRG et al., 2004).

A corrida é realizada em etapas, geralmente com a amperagem limitada a 50  $\mu$ A por tira. O tempo ótimo de focalização deve ser estabelecido empiricamente considerando cada amostra de proteína, a faixa de pH e o comprimento das tiras de pH usadas (GÖRG et al., 2004).

O desenvolvimento das tiras IPGs (*Immobilises pH Gradients*), nas quais um determinado gradiente de pH é imobilizado em uma matriz de poliacrilamida, permitiu melhor reprodutibilidade dos géis de focalização isoeétrica e resolveu alguns problemas que ocorriam quando a IEF era feita segundo O'FARREL. A técnica de eletroforese bidimensional foi aprimorada por GÖRG e atualmente é o método mais utilizado para a realização da primeira dimensão (DUNN e GÖRG, 2001). Através deste método de separação são obtidas informações importantes sobre o ponto isoeétrico das proteínas, massa molecular, nível de expressão, abundância relativa e modificações pós-traducionais, verificadas por alterações da mobilidade eletroforética das proteínas (PANDEY e MANN, 2000).

### **3.4.2. Eletroforese Desnaturante em Gel de Poliacrilamida**

A eletroforese bidimensional, ao combinar dois processos distintos de separação, pode ser usada para separar milhares de proteínas em um único gel. Na primeira dimensão (IEF), as proteínas são separadas em função das suas cargas nativas (pI). Posteriormente, a tira de gel é mergulhada no tampão de corrida (tampão SDS-PAGE) e logo em seguida colocada no topo de um gel de poliacrilamida para a realização da eletroforese de segunda dimensão, através da qual cada cadeia polipeptídica migra em função de sua massa molecular (ROCHA et al., 2005). A eletroforese é conduzida em corrente constante, em dois passos. Durante a migração inicial e período de empilhamento (passo 1) a corrente é aproximadamente metade do valor requerido para separação das proteínas (passo 2) (VERBI et al., 2005). O resultado final consiste em um gel com diversos pontos ('spots') dispersos, cada um correspondendo a uma proteína particular. O poder de separação é tão grande que duas proteínas que diferem em apenas um aminoácido carregado podem ser prontamente distinguidas (ROCHA et al., 2005).

Do ponto de vista eletroforético, as propriedades mais importantes das proteínas são a sua massa molar e a sua carga. Estes fatores são os que influenciam diretamente na velocidade de migração das mesmas ao longo da corrida eletroforética, podendo ser citados, também, o campo elétrico aplicado e a viscosidade do meio (VERBI et al., 2005). A poliacrilamida é uma matriz de gel muito comum, por ser um material quimicamente inerte, transparente e estável em uma

ampla faixa de pH, temperatura e força iônica . Ela é formada pela copolimerização entre a acrilamida e a N,N'-metilenobisacrilamida, na presença de persulfato de amônio e TEMED (VERBI et al., 2005).

Na eletroforese em gel de poliacrilamida em sistema desnaturante na presença de SDS, o surfactante é usado para desnaturar as proteínas, antes da aplicação do campo elétrico. O SDS, sendo uma molécula anfifílica, interfere nas interações hidrofóbicas que normalmente estabilizam as proteínas e estas, em geral, assumem uma forma cilíndrica na presença do mesmo. Além disso, a carga negativa que o SDS transfere para as proteínas mascara as suas cargas intrínsecas. Assim sendo, as proteínas tratadas com SDS possuem formas similares e razões massa/carga parecidas e, desta maneira, a SDS-PAGE é capaz de separar as proteínas de acordo com as suas massas molares (MAGALHÃES et al., 2005).

### **3.4.3. Eletroforese bidimensional diferencial (2D-DIGE)**

A recente evolução da tradicional técnica de 2-D, a 2D-DIGE (Two dimensional difference gel electrophoresis), primeiramente descrita por Unlu et al., (1997) tem permitido que múltiplas amostras de proteína sejam separadas no mesmo gel (multiplexação). O princípio dessa técnica envolve uma etapa, prévia à separação eletroforética, na qual cada amostra de proteína a ser analisada é marcada com um corante fluorescente. As diferentes amostras de proteínas são marcadas com corantes fluorescentes espectralmente distintos, chamados de CyDye DIGE. Uma vez marcadas, as amostras são então misturadas e separadas no mesmo gel. Concluída a etapa de separação, a fluorescência de cada amostra pode ser visualizada separadamente por meio da emissão de fluorescência do corante empregado de acordo com seu comprimento de onda de excitação. Isso é possível pela utilização de um scanner especial, o qual possui um laser que emite radiação monocromática nos comprimentos de onda específicos dos corantes (MAROUGA et al., 2005).

Para essa metodologia são disponíveis dois conjuntos de corantes fluorescentes, *minimal* (mínima) e *saturation* (saturação). O conjunto de marcação classificado como mínima, que é o mais utilizado, possui três corantes (Cy2, Cy3 e Cy5), o que permite que até três amostras sejam separadas no mesmo gel. Por

outro lado, o conjunto de marcação denominado saturação possui dois corantes (Cy3 e Cy5), permitindo a separação de até duas amostras no mesmo gel. Experimentalmente, 2D-DIGE difere muito pouco da eletroforese 2D tradicional. Basicamente, as únicas diferenças são a etapa de marcação anterior a re-hidratação das fitas (IPG) e a visualização das imagens (GE, 2004).

A maior limitação associada com a técnica 2D-DIGE está relacionada as reações químicas requeridas para ligar o corante à molécula de proteína. Assim, obviamente, essa técnica não se aplica às proteínas que não possuem lisinas (no caso de marcação com corantes mínimos) ou cisteínas (marcação com corantes de saturação) em suas sequências (ZHOU et al., 2002).

#### **3.4.4. Métodos de detecção de proteínas em géis**

Uma vez concluída a segunda dimensão, o mapa das proteínas separadas por eletroforese 2-D pode ser visualizado no próprio gel, através da sua coloração com *Coomassie blue*, nitrato de prata ou compostos fluorescentes. A seleção do agente de coloração deve ser feita levando-se em conta a sensibilidade e o tempo requeridos para a revelação do gel, a simplicidade do procedimento, bem como as etapas futuras de análise. Os métodos mais comumente empregados são a coloração com prata e corantes orgânicos, tais como o azul de *Coomassie Blue* (CANDIANO et al., 2004).

#### **3.4.5. Análise da imagem no gel bidimensional**

Os géis de eletroforese bidimensionais corados são digitalizados com o auxílio de um scanner específico. As imagens geradas são analisadas através de programas desenvolvidos para a análise dos resultados obtidos em géis 2-D. Atualmente no mercado existem vários softwares, como por exemplo, Phoretix 2D (Nonlinear Dynamics), PDQuest (Biorad), Melanie (GeneBio); ImageMaster Platinum (GE Healthcare). Estes softwares permitem a contagem do número de spots, a caracterização automática dos valores de pI e massa molecular, a análise dos

níveis de expressão, assim como diversos outros recursos para o melhoramento da qualidade da imagem (ROCHA et al., 2005).

### **3.5. Extração de proteínas de tecidos vegetais**

Atualmente a análise do proteoma de plantas, consiste em etapas cruciais para a separação e visualização de proteínas de tecidos vegetais por eletroforese bidimensional (2-D) e geralmente seguem a seguinte sequência: 1) extração de proteínas dos tecidos em tampão com agentes caotrópicos, 2) separação proteica através de 2-DE em gel de poliacrilamida, 3) digestão dos *spots in gel*, 4) identificação da proteína por espectrometria de massas, e 5) busca em bancos de dados disponíveis (GIAVALISCO et al., 2003).

A extração das proteínas é um procedimento muito essencial para garantir o sucesso da eletroforese bidimensional. Não existe um método único de extração de proteínas totais que pode ser aplicado universalmente para todos os tipos de tecidos analisados em 2-D (DUNN, 1993). Os protocolos necessitam normalmente ser adaptados e otimizados para cada tipo de amostra (GÖRG et al., 2004). Isto significa que se deve considerar o material biológico utilizado e a característica das proteínas de interesse. Células de tecidos de plantas requerem normalmente condições mais drásticas para a lise, devido à robustez da parede celular (GÖRG et al., 2004). Neste caso, muitos pesquisadores têm utilizado uma combinação de dois ou mais métodos para quebrar a parede celular e romper a membrana plasmática para a liberação das proteínas (FOUROBERT et al., 2007; KATZ et al., 2007).

Os tecidos vegetais, além de ter relativamente baixas concentrações de proteínas, são freqüentemente ricos em proteases e materiais que interferem severamente na separação e análise das proteínas, e incluem: parede celular rígida, armazenamento de polissacarídeos, lipídios, compostos fenólicos e uma ampla variedade de metabólitos secundários (TSUGITA, 1999). Como exemplos, os lipídios podem interferir na extração de proteínas de membrana, polissacarídeos e ácidos nucléicos podem interagir com os tampões utilizados na focalização isoeletrica aumentando a viscosidade da solução e fenóis podem interagir com as proteínas. Tais contaminantes tornam-se um problema especial para a eletroforese bidimensional, resultando em géis com listras horizontais e verticais, manchas e uma

redução no número de spots de proteínas distintamente resolvidos (GÖRG et al., 2004).

Desde que a técnica de 2-D foi desenvolvida por O'Farrell (1975), vários métodos de extração de proteínas vegetais têm sido desenvolvidos (JORRIN et al., 2007). Entre eles, o mais comumente método utilizado é o do ácido tricloroacético (TCA), procedimento de precipitação com acetona, que tem sido utilizado com sucesso em tecidos de plantas jovens, porém não é necessariamente a melhor escolha para outros tecidos vegetais mais complexos (CARPENTIER et al., 2005; SARAVANAN e ROSE, 2004, WANG et al., 2003). Para a cana de açúcar existem vários protocolos de extração de proteínas, mas nenhum tem se mostrado satisfatório a todos os tecidos da planta.

### **3.6. Identificação de proteínas por Espectrometria de Massas**

A espectrometria de massas (MS) trata-se de uma ferramenta fundamental para aplicações proteômicas, fato esse atribuído à sua capacidade de analisar proteínas e peptídeos com alta especificidade, precisão, velocidade e sensibilidade. Apesar da MS ser uma técnica centenária, sua aplicabilidade na área biológica tornou-se notória e praticamente imprescindível somente depois do desenvolvimento das técnicas brandas de ionização (ESI – Electro Spray e MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), ocorridas no final dos anos 80 (AEBERSOLD, 2003).

A espectrometria de massa determina a massa molecular através da relação carga/massa ( $m/z$ ) de íons gerados a partir da molécula analisada. Atualmente MALDI é a tecnologia mais utilizada para a ionização das proteínas e sua subsequente identificação (KOPKE, 2003). O equipamento MALDI, acoplado a um analisador de massas tipo tempo de voo (ToF), é normalmente utilizado para a obtenção da impressão digital de peptídeos (PMF) de proteínas e outras moléculas (AEBERSOLD e GOODLET, 2001).

A tripsina, normalmente utilizada para a digestão das proteínas, faz clivagem específica C-terminal adjacente a resíduos de arginina e lisina, gerando um conjunto de peptídeos únicos cujas massas são determinadas por espectrometria de massa (SHEVCHENKO et al., 1996; CAGNEY et al., 2003) e que podem ser considerados como impressão digital daquela molécula (QUADRONI e JAMES, 2001).

A identificação acontece a partir da observação de como a molécula interage com o campo e com qual velocidade se desloca, já que cada molécula deve ter características mais ou menos particulares (dependendo dos átomos que a compõem). Porém, no caso das proteínas (e de outras macromoléculas), a técnica ainda era muito limitada, devido à dificuldade de ionizá-las sem destruí-las. Fenn, em 1988, conseguiu o efeito de ionização recobrando superficialmente a proteína com uma substância ácida, a partir de um jato líquido “disparado” por um campo elétrico (ionização por eletrospray). No mesmo ano, Tanaka obteve o mesmo efeito de ionização, utilizando, em vez do spray líquido, um gás, e, para dispará-lo, a energia de um laser. Tais avanços mostram que, embora “sob todos os critérios, a instrumentação atual esteja longe de ótima” para que a proteômica consiga efetivar todo o seu potencial – como afirmam Tyers e Mann (2003), os limites tornam-se rapidamente cada vez mais tênues. Outra medida do progresso técnico é o número de proteínas identificadas em cada estudo.

Um avanço tecnológico relevante que contribuiu para o desenvolvimento da MS foi à conjugação de analisadores de massa em seqüência (MS/MS). Tal arranjo aumentou muito o poder de resolução e a sensibilidade da técnica, tornando-a praticamente obrigatória nas análises de moléculas biológicas. Com esta técnica é possível fragmentar uma molécula ionizada pela colisão com um gás inerte (argônio, hélio, nitrogênio). A análise das massas dos fragmentos obtidos fornece informações sobre estrutura da molécula original, permitindo determinar, por exemplo, a seqüência de aminoácidos de um peptídeo ou uma alteração de algum resíduo de aminoácido (STTEN et al., 2004).

O processo de ionização/desorção a laser assistida por matriz (MALDI) ocorre com a solução contendo a amostra misturada à uma solução super-saturada de matriz orgânica, a qual absorve fortemente radiação eletromagnética em um determinado comprimento de onda. A solução resultante dessa mistura é então aplicada a uma placa metálica de MALDI (volumes da ordem de poucos microlitros). Após alguns minutos o solvente terá evaporado e ocorrerá a cristalização da amostra juntamente com o excesso de matriz. A placa é então transferida para dentro do espectrômetro e o cristal formado bombardeado por feixe de laser de alta potência com comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção da matriz. Essa energia é absorvida em grande parte pela matriz, a qual está em excesso, e transferida de maneira branda para a amostra, de modo que ocorre a

sublimação do analito e da matriz, resultando em íons em fase gasosa que seguirão para o analisador de massas (ZENOBI et al., 1998).

Em ionização por eletrospray (ESI) todo o processo de ionização ocorre à pressão e temperatura atmosférica. Uma solução levemente ácida (ou básica) contendo a amostra é bombeada a uma vazão de alguns microlitros por minuto através de um tubo capilar metálico submetido a uma alta diferença de potencial (3 – 5 kV) em relação ao eletrodo cilíndrico que circunda a saída do capilar. Assim, forma-se um spray com gotículas carregadas que passam através de um gás secante, ocorrendo a evaporação do solvente. Como consequência da evaporação do solvente as gotículas carregadas tornam-se cada vez menores de modo que a densidade de carga torna-se tão alta que as moléculas carregadas aprisionadas nas gotículas são “ejetadas” para a fase gasosa, seguindo para o analisador de íons (ARDREY, 2003).

Em relação aos analisadores de massas, existem diversos tipos com diferentes princípios, vantagens e desvantagens de acordo com a aplicação pretendida. Os analisadores do tipo TOF (time-of-flight) são os mais empregados em associação com MALDI e, por princípio, os mais simples. Eles baseiam-se na separação dos íons de diferentes  $m/z$ , porém, com a mesma quantidade de energia cinética. Após desorvidos da matriz, os íons são acelerados em direção ao detector através de um tubo de vôo, mantido sob alto vácuo, por meio da aplicação de uma alta diferença de potencial (entre 15-30 kV). Assim, o tempo necessário para atingir o detector é proporcional a tensão aplicada e a relação  $m/z$  dos íons (JAMES, 1997).

Atualmente existem dois tipos de íon traps comercialmente disponíveis, o íon trap tridimensional, modelo convencional (PAUL, 1990) e o íon trap linear (Linear Íon Trap – LIT) (SCHWARTZ et al., 2002). São considerados equipamentos robustos, altamente sensíveis, seletivos e podem ser facilmente interfaceados com diversas fontes de ionização, principalmente ESI. Não são instrumentos que proporcionam altas resoluções e exatidão de massas e em geral limitam-se a análise de espécies com relação  $m/z$  inferior a 2000, porém alguns modelos estendem esse valor até 16000. No entanto, possuem como característica diferencial a capacidade de realizar múltiplos estágios de fragmentação (MS) (MARCH, 1997).

Para a detecção desses íons, os potenciais são alterados de modo a desestabilizar o movimento dos íons, resultando na ejeção desses através do eletrodo *endcap* de saída. Assim, um espectro de massas é gerado pela ejeção

seqüencial dos íons em ordem crescente de  $m/z$  proporcionada pela mudança gradual nos potenciais. Por fim, os íons são ejetados através de fendas nos eletrodos *endcaps* e detectados, geralmente por um elétron multiplicador (BUSTILLOS, 2003).

### 3.7. Bancos de dados

A identificação de proteínas a partir da espectrometria de massa e de outras técnicas depende, em grande parte, da comparação dos resultados obtidos com grandes bancos de dados. Os softwares de busca comumente empregados para a identificação de proteínas em bancos de dados a partir de MS são o Sequest (ENG et al., 1994) e o Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) (PERKINS et al., 1999). Ambos os programas correlacionam espectros de massas de fragmentação (não interpretados) de peptídeos com sequências de aminoácidos de proteínas registradas em bancos de dados (CHAMRAD et al., 2004; ELIAS et al., 2005).

Durante as buscas, os programas interpretam os espectros gerados pelos peptídeos ou pela fragmentação destes e, a partir de digestões teóricas de proteínas ou fragmentação teórica de peptídeos depositados nos bancos de dados, comparam os valores obtidos. As comparações entre as informações teóricas e experimentais geram listas de proteínas com diferentes graus de similaridade e estas, são ordenadas de acordo com a probabilidade estatística determinada pelo algoritmo e pelos parâmetros definidos pelo usuário (CHAMRAD et al., 2003). Se a primeira proteína do banco de dados possuir algum peptídeo com a mesma massa molecular do peptídeo em estudo passa-se então, a comparar os espectros de MS/MS. Caso não ocorra esta coincidência, uma próxima proteína do banco de dados deve ser avaliada da mesma forma.

No entanto, quando uma proteína do banco de dados é identificada com a amostra, os resultados obtidos com a busca recebem uma pontuação (*score*). Além desta informação, são fornecidos dados relativos ao número de acesso no banco de dados (NCBI), massa molecular, potencial isoelétrico, cobertura da sequência, espectros de massa (MS) e MS/MS da proteína identificada.

Assim, a combinação dos dados espectrais de MS e MS/MS adquiridos experimentalmente com as ferramentas de buscas de dados, possibilita que

proteínas provenientes de digeridos de gel 2D, sejam caracterizadas na elucidação de misturas protéicas complexas (GIORGIANNI, 2003).

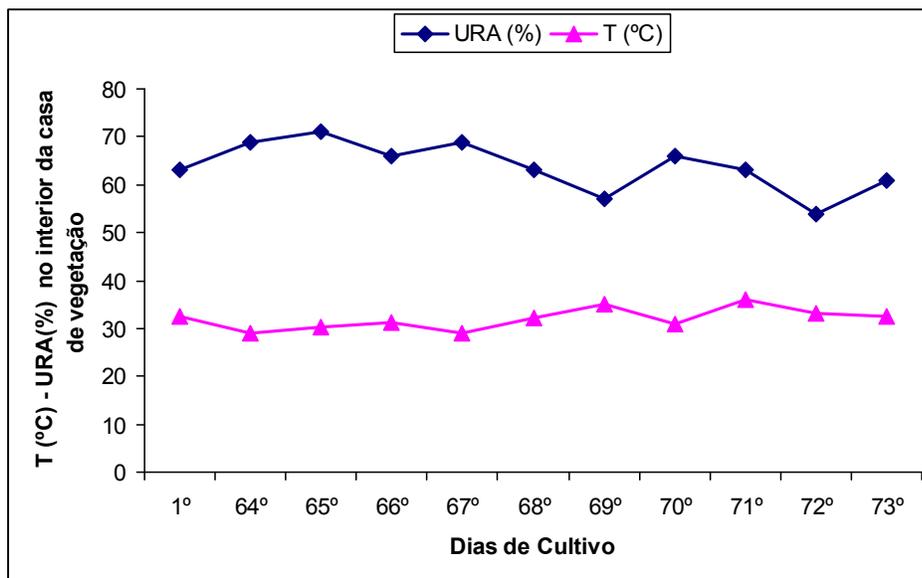
# **4. METODOLOGIA**

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Materiais e Métodos

#### 4.1.1. Instalação do Experimento

O experimento foi realizado nas estruturas físicas da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizada no município de Rio Largo (09° 28' S, 35° 49' W e 127 m de altitude), Estado de Alagoas, Brasil, com temperatura e umidade controladas (Figura 2). Foram utilizados dois genótipos de cana-de-açúcar escolhidas com base nas informações cedidas junto ao programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (PMGCA-CECA-UFAL) - RIDESA. Os dois genótipos estudados pertencem ao grupo das variedades consideradas tolerantes (RB72910) e suscetíveis (RB72454) ao estresse hídrico.



**Figura 2.** Temperatura e umidade relativa do ar da casa de vegetação durante as análises fisiológicas dos genótipos de cana-de-açúcar submetidos ao estresse hídrico.

Os genótipos foram plantados inicialmente na forma de mini-rebolos em caixas individuais de dimensões 40 cm x 30 cm x 10 cm, contendo como substrato polpa de coco, torta de filtro e terra preta, na proporção de 1:1:2 (v/v), após receberem tratamento prévio com fungicida. Foram utilizadas 12 caixas, contendo 12 mini-rebolos/caixa para cada genótipo com regas periódicas, sendo posteriormente transplantados para vasos de 10L contendo o mesmo substrato.

A condução do experimento se deu por 66 dias, com delineamento experimental inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial, 2 (variedades) x 2 (dois regimes de umidade do solo - controle e estressado) x 3 (três períodos de avaliação fisiológica - níveis de estresse) x 4 (repetições). Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste Tukey, com  $P < 0,05$ . As plantas foram mantidas em condições ideais de umidade com reposição diária da água evapotranspirada através da pesagem individual dos vasos por 66 dias, realizada em balança digital, até o ponto de início da suspensão da rega.

Durante o desenvolvimento da planta, manteve-se o substrato na condição de umidade próxima de sua capacidade de campo, determinada no laboratório de ciências do solo da Universidade Federal de Campina Grande-PB, através da curva de retenção de água no solo. Portanto, para analisar a disponibilidade de água no solo para a planta, utilizou-se o método-padrão de estufa (gravimétrico) e então só assim submeter a planta a uma deficiência hídrica de 80% para os tratamentos sob estresse.

Cada tratamento apresentou dois grupos: um de plantas sem irrigação e outro de plantas-controle, sendo cada um composto por quatro repetições de forma a ter uma maior confiabilidade nos resultados. A primeira coleta se deu após 2 dias de supressão da irrigação e a segunda coleta foi após 3 dias da volta da irrigação para que fossem normalizadas as condições de umidade por igual período, equivalendo a um total de 73 dias de cultivo.

#### **4.2. Coleta e acondicionamento do material vegetal**

As folhas de plantas de cana-de-açúcar dos tratamentos foram coletadas quando apresentaram uma deficiência hídrica de 80% de água disponível (déficit hídrico de -1,1 MPa), acondicionadas em sacos plásticos, imediatamente

congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas em Ultra-Freezer (-80°C) até a realização das extrações.

#### **4.3. Determinação do Potencial hídrico foliar**

O potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) foi determinado em folhas completamente expandidas de plantas distintas, por meio de uma bomba de pressão (Soil Moisture, Equipment Corporation, Santa Bárbara, USA) realizada em duas etapas: entre a antemanhã (folhas +2) (potencial hídrico de base) e o meio-dia, em folhas que se encontravam em perfeito estado e no máximo de atividade fotossintética (folhas +1) conforme descrito por Da Matta et al. (1997). As folhas foram cortadas na lígula, colocadas em sacos plásticos previamente identificados, de acordo com cada tratamento e acondicionadas em caixa térmica contendo gelo para minimizar a perda de umidade e levadas ao laboratório para realização das análises.

#### **4.4. Extração de proteínas**

Para extração de proteínas de folhas de cana-de-açúcar foram avaliados três métodos de extração de proteínas que apresentassem uma melhor preparação, resolução e separação dos spots para a eletroforese bidimensional.

##### **4.4.1. Metodologia 1: Extração em solução de ácido tricloroacético (TCA)**

Essa metodologia foi baseada segundo modificações do método descrito por Damerval *et al.*, (1986). As folhas foram pulverizadas em almofariz pré-resfriado com nitrogênio líquido. O material pulverizado (aproximadamente 1 grama) foi ressuspenso em tampão contendo Tris-HCl 50 mM (pH 7,5),  $\beta$ -mercaptoetanol 14 mM e Fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF) 1 mM. Após 10 minutos de homogeneização constante em gelo, o material foi então centrifugado a 10.000 g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e acrescentado 10 mL de 10% TCA em acetona e incubadas a -20°C por 2 horas para

precipitação das proteínas. Em seguida, o extrato protéico foi centrifugado por 10.000 g a 4°C por 15 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes em acetona 80% gelada. A cada etapa o precipitado foi agitado por 1 minuto e centrifugado por 15 minutos a 10.000 g a 4°C. O precipitado foi seco a temperatura ambiente e dissolvida em tampão de solubilização contendo 7M de uréia, 2M de tiuréia e 2% de triton x-100 e, armazenadas a -20°C.

#### **4.4.2. Metodologia 2: Extração com solução de ácido tricloroacético em acetona**

Essa metodologia foi baseada em Shen *et al.*, (2002) com modificações. O material pulverizado foi ressuspenso em tampão de extração contendo Tris-HCl 40 mM (pH 7,5), Polivinil polipirrolidona (PVPP) 0,2% (m/v), sacarose 250 mM, EDTA 10mM, triton x-100 1% (v/v), PMSF 1mM, β-mercaptoetanol 2% (v/v). A amostra foi agitada por um minuto e mantida sob homogeneização constante em gelo por 2 horas. O material foi centrifugado por 15 minutos a 12.000 g a 4°C e o sobrenadante foi repassado para um novo tubo se acrescentado mais 10 mL do tampão de extração. Centrifugou-se novamente por 15 minutos a 12.000 g a 4°C. Transferindo-se em seguida o sobrenadante para a um tubo novo, ao qual foram acrescentado 10 mL de 10% TCA em acetona. O material foi incubado a -20°C por 12 horas. Em seguida, as proteínas foram lavadas por três vezes em solução 10% de TCA/acetona e uma vez em etanol 80%. Durante a lavagem o material foi centrifugado por 15 minutos a 10.000 g a 4°C. O precipitado foi seco à temperatura ambiente e dissolvido em tampão de solubilização contendo de uréia 7M, de tiuréia 2M, 2% de triton x-100 e, armazenadas a -20°C.

#### **4.4.3. Metodologia 3: Extração em tampão Fenol/SDS**

Essa metodologia foi baseada em Wang *et al.*, (2003), com algumas modificações. Esse método de extração constou de três etapas.

Etapa 1. Homogeneização do material foliar

O material pulverizado foi ressuscitado em solução contendo PVPP 1% (m/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 2% (v/v), PMSF 1mM em acetona gelada e mantido sob homogeneização constante em gelo por 2 horas. Após a centrifugação por 15 minutos a 10.000 g a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com acetona gelada. O processo foi repetido 5 vezes e o material em seguida foi seco e liofilizado.

#### Etapa 2. Lavagem do precipitado

O precipitado foi lavado por 4 vezes com 10 mL de TCA 10% em acetona gelada, centrifugado por 10 minutos a 10.000 g (4°C). Para cada etapa o material foi agitado por 30 segundos em vortex, lavado 2 vezes com 10% TCA em água, lavado 2 vezes em acetona 80% e uma vez em etanol 80%. Para cada lavagem o precipitado foi ressuscitado e centrifugado e, em seguida liofilizados.

#### Etapa 3. Extração e precipitação das proteínas

O precipitado foi ressuscitado em tampão de extração contendo SDS-denso (sacarose 30%, SDS 2%, Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0), PMSF 1mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2% (v/v). Após agitação por 10 minutos à temperatura ambiente, foi adicionado tampão tris-fenol saturado (pH 8,0;) e o material foi agitado novamente em gelo por 10 minutos. Posteriormente a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 g a 4°C e a fração fenólica foi coletada e transferida para um novo tubo. As proteínas da fase fenólica foram precipitadas adicionando-se 5 volumes de acetato de amônio 0,1M em metanol e incubadas por 12 horas a -20°C. Em seguida o extrato protéico foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 x g a 4°C. O precipitado recuperado foi lavado duas vezes em acetato de amônio 0,1M, duas vezes em acetona 80% e mais uma vez em etanol 80%. A cada etapa o precipitado foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 10.000 g a 4°C. O precipitado foi liofilizado e as proteínas foram dissolvidas em tampão de solubilização contendo 7M de uréia, 2M de tiuréia e 2% de triton x-100. As amostras foram sonicadas três vezes por 30 segundos, centrifugadas e, armazenadas a -20°C.

### 4.5. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita segundo método descrito por Bradford (1976) utilizando Bradford reagent – Protein dye reagent (SIGMA) e utilizando

albumina sérica bovina (BSA) como padrão, segundo recomendações do fabricante. As absorvâncias foram determinadas a 595 nm.

#### **4.6. Análise de proteínas por SDS-PAGE e eletroforese bidimensional (2D)**

##### **4.6.1. Eletroforese unidimensional (1D)**

As análises da pureza e degradação das amostras foram realizadas por SDS-PAGE de acordo com Laemmli (1970). As amostras protéicas foram desnaturadas a 95°C na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol por cinco minutos e resolvidas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12%. Utilizaram-se para cada amostra 30 $\mu$ g de proteína. Os géis foram corados utilizando solução Coomassie Brilhante blue G-250, 0,1%.

##### **4.6.2. Eletroforese Bidimensional (2D)**

###### **4.6.2.1. Primeira dimensão**

As proteínas foram primeiramente separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI), através do processo de focalização isoelétrica (IEF). Foram utilizadas tiras comerciais de gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado (IPG). A caracterização preliminar das proteínas presentes na amostra foi realizada com fitas IPG de 13 cm com gradiente de pH imobilizado linear de 3-10 e 4-7. As tiras foram reidratadas e posteriormente submetidas à análise por IEF, em seguida, armazenadas a -20° C para posterior análise.

###### **4.6.2.2. Reidratação das fitas de gradiente de pH imobilizado**

As fitas IPG foram reidratadas durante um período de 12 horas a 20°C no aparato para focalização isoelétrica (IPGphor, Amersham GE Healthcare) com 250  $\mu$ L de amostra, contendo aproximadamente 800  $\mu$ g de proteína dissolvido no tampão de hidratação (uréia 7M, tiuréia 2M, triton x-100, 10 mM de DTT, 0,5% IPG buffer,

125 µL tampão de reidratação (Amersham GE Healthcare) e 0,005% m/v de azul de bromofenol). Sobre as fitas foi aplicado 1,5 mL de fluid cover (Amersham GE Healthcare) para evitar a evaporação da amostra durante a reidratação. Esse processo foi utilizado para todas as amostras analisadas.

#### 4.6.2.3. Focalização Isoelétrica

Depois de reidratadas as fitas foram retiradas das canaletas e colocadas em um suporte de cerâmica com óxido de alumínio (*manifold*), posicionado no aparelho de IPGPhor III (Amersham GE Healthcare) onde a focalização isoelétrica foi conduzida. Cada tira foi posicionada com o gel voltado para cima em contato com os eletrodos. Papel filtro umedecido foi colocado em cada extremidade ácida e básica do gel a fim de estabelecer um contato entre o gel e os eletrodos e cobertas com 3 mL de dry strip fluid™ (GE Healthcare).

As condições de corrida incluíram uma etapa inicial de 500 Volts/hora (Vh) na qual se manteve constante por um determinado tempo. Após essa etapa, um gradiente de potencial de 3500 V/h foi aplicado até o máximo do valor desejado e por fim, esse valor de 3500 V/h, foi mantido por um tempo necessário para que a quantidade de voltagem acumulada (18 kVh) seja atingida. A temperatura de 20°C foi mantida constante e aplicada uma amperagem de 50 µA por fita. Após a IEF, as fitas foram colocadas em tubos de ensaio, vedados e armazenadas a -20°C até posterior utilização.

#### 4.6.2.4. SDS-PAGE

Para a segunda dimensão, as fitas IPG foram lavadas em água destilada, mantidas por 15 minutos em solução de equilíbrio e redução (Tris-HCl 50 mM e pH 6,8; uréia 6M; glicerol 30%; SDS 2%; azul de Bromofenol 0,002% e DTT 2%). Após agitação suave, a fita foi transferida e mantida por 15 minutos em uma solução de alquilação (tris-HCl 50mM e pH 6,8; uréia 6M; glicerol 30%; SDS 2%; azul de Bromofenol 0,002% e iodoacetamida 2,5%). A segunda dimensão foi constituída de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% em condições desnaturantes contendo

Tris-HCl 0,375M e pH 8,8; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,05%; TEMED 0,034%. Depois de equilibradas, as fitas IPG foram colocadas sobre o gel da segunda dimensão e seladas com solução de agarose 0,5% (m/v) em tampão de corrida Tris-Glicina (tris 0,025M; glicina 0,192M; SDS 0,1%). A separação eletroforética das proteínas foi realizada em uma cuba modelo Rubi SE 600 (Amersham GE Healthcare). Na primeira etapa utilizou-se uma corrente fixa de 15mA por gel durante 30 minutos e na segunda etapa, utilizou-se uma corrente fixa de 30mA por gel durante aproximadamente 4 horas.

#### 4.6.2.5. Coloração

Após a eletroforese, os géis foram lavados e as proteínas visualizadas por impregnação com *Coomassie Blue* coloidal, conforme modificação do método descrito por Candiano *et al.*, (2004). Os géis foram tratados com as seguintes soluções: solução fixadora (Etanol 40% v/v e Ácido Acético 10% v/v) por 12 horas e em seguida com solução de coloração (Ácido fosfórico 10% v/v, sulfato de amônio 15% m/v, metanol 17% v/v e *Coomassie blue* coloidal 0,1% m/v) por 72 horas. O excesso do corante foi removido com água deionizada e os géis conservados em solução de ácido acético 1% até a digitalização das imagens.

#### 4.6.2.6. Análises dos géis

Os géis foram escaneados e calibrados e as imagens foram obtidas através do programa *Labscan* e suas imagens digitalizadas e analisadas no programa *ImageMaster 2D platinum 7.0* (Amersham GE Healthcare). A autenticidade e o contorno de cada “spot” foram determinados automaticamente e, posteriormente, validados por inspeção visual e editados quando necessários. Três repetições foram realizadas para cada metodologia de extração, sendo avaliados o número de “spots” detectados e a resolução dos géis obtidos. As massas moleculares aparentes foram determinadas utilizando padrões de massa molecular (Wide Molecular Weight Range – Sigma) presentes em cada gel. A detecção dos spots e sua determinação de volume foi realizada de modo automático pelo *imageMaster* adotando os

seguintes parâmetros: smooth = 3, área mínima = 5 e saliência = 250. Os alinhamentos entre os géis das repetições foram realizados automaticamente, utilizando três “spots” como referência, seguido de inspeção e correção manual quando necessário.

#### **4.7. Descoloração dos spots**

Após a obtenção das imagens digitais dos géis, os spots foram manualmente retirados dos géis, de acordo com o tamanho do spot. Os fragmentos foram acondicionados em microtubos de 1,5mL previamente lavados com metanol (2 vezes). Esta lavagem serviu para que possíveis resíduos de plásticos fossem eliminados uma vez que esses compostos freqüentemente são observados como interferentes nos espectros de massas.

Estes fragmentos de gel foram descolorados empregando-se três lavagens sucessivas com solução de bicarbonato de amônio 25mM em acetonitrila 50% (pH 8,0). Ao final, foi efetuada uma lavagem com água Milli-Q para remoção completa do bicarbonato de amônio e, o sobrenadante, foi desprezado.

#### **4.8. Desidratação dos spots**

Após descoloração, os spots foram desidratados pela adição de 200 µL de acetonitrila 100%, incubados por cerca de 5 minutos, à temperatura ambiente e, em seguida a acetonitrila foi removida e os géis foram completamente secos em *speed vac*.

#### **4.9. Digestão tríptica**

A digestão enzimática realizada com tripsina possibilita uma especificidade elevada ao promover a quebra das seqüências peptídicas nos resíduos de lisina e arginina. O gel foi re-hidratado com 10 µL de uma solução gelada de Tripsina 0,02 µg (PROMEGA, cat. # V511A) por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foi adicionado 20 µL

de solução de bicarbonato de amônio 50mM a reação enzimática e, esta mistura foi incubada por 12 horas a 37°C (16-24h).

#### **4.10. Extração dos peptídeos**

Passado o período de incubação, o sobrenadante foi transferido para um tubo novo de 500 µL. Para a extração dos peptídeos digeridos, foram adicionados 30 µL de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% ao fragmento de gel e a mistura foi suavemente agitada por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido ao novo tubo e o procedimento foi repetido por mais uma vez. As amostras foram concentradas até 10 µL (cerca de 1h, com Speed Vac operando para solventes voláteis).

#### **4.11. Dessalinização das amostras**

Uma vez digeridos e extraídos, os peptídeos foram submetidos a um processo de dessalinização e purificação empregando, para isso, colunas Zip Tip® com resina C<sub>18</sub>. Tal procedimento objetivou a melhor ionização das moléculas e conseqüente identificação das proteínas com os dados obtidos no espectrômetro de massas. Os peptídeos aplicados à coluna foram lavados com solução 0,2% de ácido fórmico e, eluídos com 8 µL de acetonitrila 50% em ácido trifluoroacético 0,1%. O elutato foi concentrado em speed vac e, analisado em espectrômetro de massas MALDI-TOF-TOF.

#### **4.12. Análise por espectrometria de massas**

Os peptídeos provenientes da digestão trípica dos spots dos géis, foram analisados em Espectrômetro de Massas MALDI-TOF-TOF MS/MS (Autoflex III Smartbeam, Bruker Daltonics Handelsregister, Bremen, Germany). As análises foram realizadas no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas (Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais) em Belo Horizonte – MG.

A matriz empregada foi o ácido ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA). Volumes iguais de uma solução 0,5 µL da matriz e da amostra foram homogeneizados e aplicados na placa de MALDI. Após a cristalização da mistura (amostra + matriz), espectros de MS e MS/MS foram adquiridos de forma automática, através de uma varredura no intervalo de  $m/z$  compreendido entre 1000 e 3000. Picos com intensidade superiores a 30 unidades foram submetidos à fragmentação (MS/MS) na câmara de colisão e, os dados de MS e MS/MS obtidos experimentalmente, foram empregados na determinação da identidade das proteínas através da ferramenta Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

Os espectros de massa (MS) e espectros de massa em *tandem* (MS/MS) foram obtidos no modo positivo, e o modo de operação foi *linear*, *Laser repetition rate* a 50 Hz, *Íon source voltage 1* a 20 kV, *Íon source voltage 2* a 18,3 kV, *Íon source lens voltage* 6,75 kV e *number of shots* de 2000. Para a fragmentação de peptídeos tripsinolizados no PMF (*Peptide Mass fingerprinting*), foi empregado o método CID (*Collision induced dissociation*).

#### 4.13. Busca no banco de dados MASCOT

As buscas no banco de dados são realizadas a partir das informações espectrométricas (MS e MS/MS) obtidas por MALDI-TOF-TOF, através dos parâmetros empregados, o MASCOT submeteu a busca de todos os spots analisados. Os espectros gerados foram comparados com dados depositados no National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Peptídeos sem homologia em nenhum dos bancos foram comparados com sequências de bancos de dados públicos usando BLASTp (Basic Length Alignment Search Tool), um algoritmo que permite a identificação de proteínas via alinhamento preciso de sequências curtas de aminoácidos (short nearly, exact matches).

A identificação, quando assim ocorre, recebe uma pontuação em termos de probabilidade (*score*). Quando a confiança desta identificação não atinge níveis aceitáveis, uma próxima proteína da lista do banco de dados é submetida à digestão teórica e assim sucessivamente, até que a proteína em questão seja inequivocamente identificada.

# **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Determinação do potencial hídrico na folha ( $\Psi_w$ )

No experimento, os genótipos tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico foram mantidos em condições ideais com reposição diária da água evapotranspirada, e 66 dias após o plantio, quando as plantas estavam em pleno crescimento vegetativo foi iniciada a restrição hídrica nos tratamentos que estariam sob regime de déficit hídrico até atingir 80% de deficiência de água. A reposição da água no solo foi realizada sempre no início da manhã. As medições do potencial hídrico foliar foram determinadas pela antemanhã, antes do início da transpiração e ao meio-dia, quando se encontrava em perfeito estado e no máximo de atividade fotossintética (Figura 3).



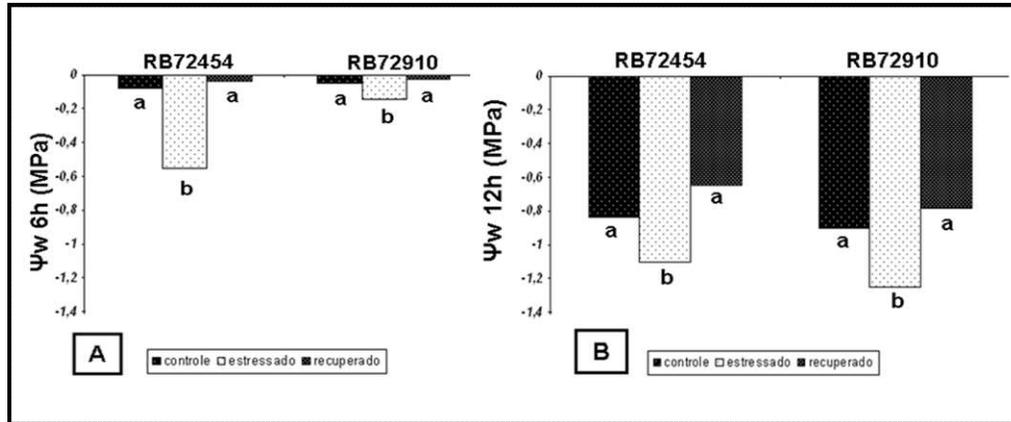
**Figura 3.** Plantas de cana-de-açúcar dos genótipos estudados sob diferentes condições de estresse.

Sob constante irrigação (plantas controle), alterações não significativas no potencial hídrico na antemanhã ( $\Psi_{am}$ ) foram observadas entre os dois genótipos, e as médias variaram entre -0,087 MPa e -0,053 MPa (Figura 4). Após 3 dias da suspensão da irrigação, o potencial hídrico diminuiu de -0,087 MPa nas plantas controle para -0,553 MPa nas plantas do genótipo sensível, enquanto nas plantas do genótipo tolerante, o potencial hídrico passou de -0,053 para -0,146 MPa. Quando a irrigação foi retomada, o  $\Psi_{am}$  nos dois genótipos previamente estressados

aumentaram de -1,10 MPa (genótipo sensível) e -1,25 MPa (genótipo tolerante) para -0,040 MPa e -0,03 MPa, respectivamente, ambos genótipos foram capazes de se restabelecer e alcançar taxas com valores próximos aos seus respectivos controles, indicando uma excelente habilidade das plantas em recuperar sua turgescência. No potencial hídrico ao meio dia ( $\Psi_{md}$ ) não foram observadas alterações significativas entre os genótipos contrastantes.

Já o potencial hídrico entre os tratamentos declinou significativamente nos genótipos sob condições de estresse hídrico atingindo valores de -0,553 MPa e -1,10 MPa as 6:00h e 12:00h respectivamente para o genótipo sensível e -0,146 MPa e -1,25 MPa as 6:00h e 12:00h respectivamente para o genótipo tolerante. Os dois genótipos apresentaram respostas semelhantes quanto aos seus respectivos tratamentos, podendo indicar que este seja um mecanismo de defesa a tolerância a seca. Assim, pode ter ocorrido redução no potencial osmótico e, conseqüentemente, aumento da absorção de água mesmo sob estresse.

Inman-Bamber e Smith (2005) obtiveram resultados semelhantes com plantas de cana-de-açúcar, com valores superiores a -0,05 MPa (6:30h) e -1,0 MPa (12h) e de -0,2 MPa (6:30h) e -1,5 MPa (12h). Siddique et al. (2000) comparando quatro variedades de trigo em resposta ao déficit hídrico no solo registraram uma redução significativa de 68,5% no  $\Psi_w$  foliar atribuído a uma possível mudança na pressão osmótica, que é um dos componentes de potencial hídrico. Nesse sentido, Bergonci et al. (2000) observaram que o potencial da água na folha de milho foi sensivelmente menor do que em plantas irrigadas, mostrando que pode ser indicador de déficit hídrico.



**Figura 4.** Potencial hídrico da antemãhã (A) e ao meio dia (B) em folhas de dois genótipos de cana-de-açúcar submetidas aos tratamentos controle (100% de AD), estresse severo (20% de AD) e recuperação (voltando a 100% de AD).

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos. As comparações entre as médias foram realizadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores representam a média de quatro repetições  $\pm$  erro padrão (EP).

De um modo em geral e de acordo com Rosenthal et al. (1987) a taxa relativa de transpiração ou expansão foliar está correlacionada à AD (água disponível nas plantas). Ritchie et al. (1972) encontraram que valores de AD menores que 0,25 produziram significativa redução na área foliar de plantas de sorgo. Valores semelhantes foram relatados por Meyer e Green (1980), já as investigações de Rosenthal et al. (1987) demonstraram que a inibição no desenvolvimento da área foliar ocorreu quando a AD foi inferior a 0,50.

Muitos trabalhos têm procurado definir o limite crítico de água no solo, a partir do qual o desenvolvimento da planta e a produção da cultura são afetados significativamente. A limitação na área foliar pode ser considerada como uma primeira reação das plantas em relação ao déficit hídrico (TAIZ e ZEIGER, 1991). A sensibilidade do desenvolvimento das folhas ao déficit hídrico pode mudar durante todo o dia, ou nas diferentes estações do ano, porém, de modo geral, o entendimento dos mecanismos utilizados pela planta é, segundo Shultz e Matthews (1993), ainda limitado.

Os valores de potencial hídrico da folha refletem bem o status de água na planta. Porém, não há um valor específico de potencial hídrico da folha para fechamento estomático, numa determinada espécie em particular, uma vez que este

potencial varia conforme a posição da folha na planta, a idade e as condições de crescimento ou ambiente onde a planta se desenvolve (DAVIES et al., 1990).

## 5.2. Avaliações dos métodos de extração de proteínas

Foram avaliados três métodos de extração de proteínas para uso em 2-D de proteínas totais de folhas de cana-de-açúcar: método 1 (ácida), método 2 (ácida modificada) e método 3 (fenólica), utilizando-se a mesma amostra e exatamente as mesmas condições experimentais. Os extratos protéicos obtidos pelos três métodos em estudo foram submetidos à análise por eletroforese uni e bidimensional.

Existem vários protocolos de extração de proteínas de plantas publicados e quase sempre estes são adaptados conforme o tipo de tecido analisado, a espécie em questão e às proteínas de interesse. As recomendações são que o método tenha como princípio básico: ser o mais simples possível, com reprodutibilidade e as modificações durante o preparo da amostra devem ser minimizadas, pois podem resultar em artefatos no gel bidimensional (DUNN, 1993; GÖRG et al., 2004).

A quantificação foi realizada pelo método de Bradford, com um rendimento de 130 µg (método 1), 170 µg (método 2) e 220 µg (método 3) de proteína solúvel por grama de tecido vegetal. A tabela 1 apresenta a quantidade de proteínas totais extraídas para cada método avaliado.

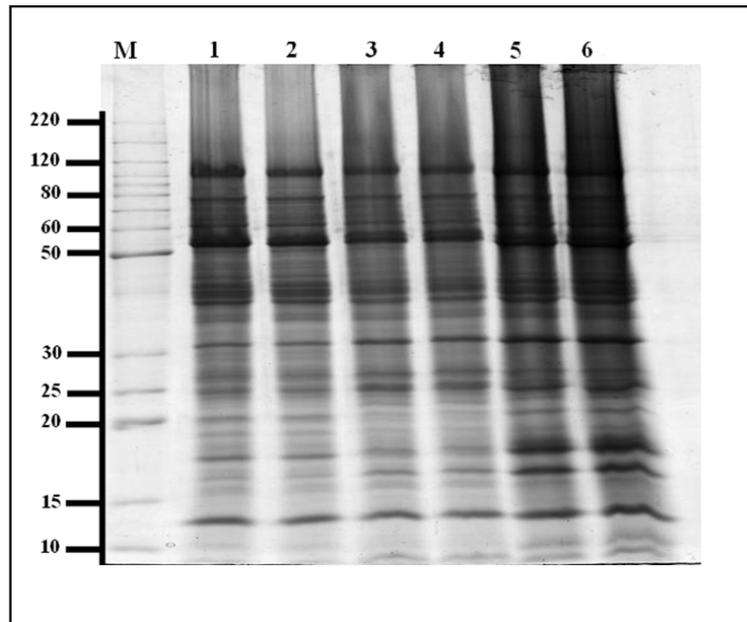
O método ácido (método 1) não apresentou uma eficiência no rendimento protéico para folhas de cana-de-açúcar e sua amostra resultou em uma baixa qualidade nos géis, sendo um método pouco sensível para detecção dos *spots* quando submetidos a eletroforese bidimensional (Figura 5), já os métodos 2 e 3 resultaram em géis de boa qualidade com poucas impurezas e centenas de spots bem resolvidos.

**Tabela 2.** Quantificação de proteínas usando os diferentes métodos de extração nos tecidos foliares de cana-de-açúcar.

Métodos	Quantidade proteína (MG)
Metodologia 1	13,33 ± 0,72 <sup>a</sup>
Metodologia 2	17,00 ± 1,12 <sup>b</sup>
Metodologia 3	22,33 ± 0,80 <sup>c</sup>

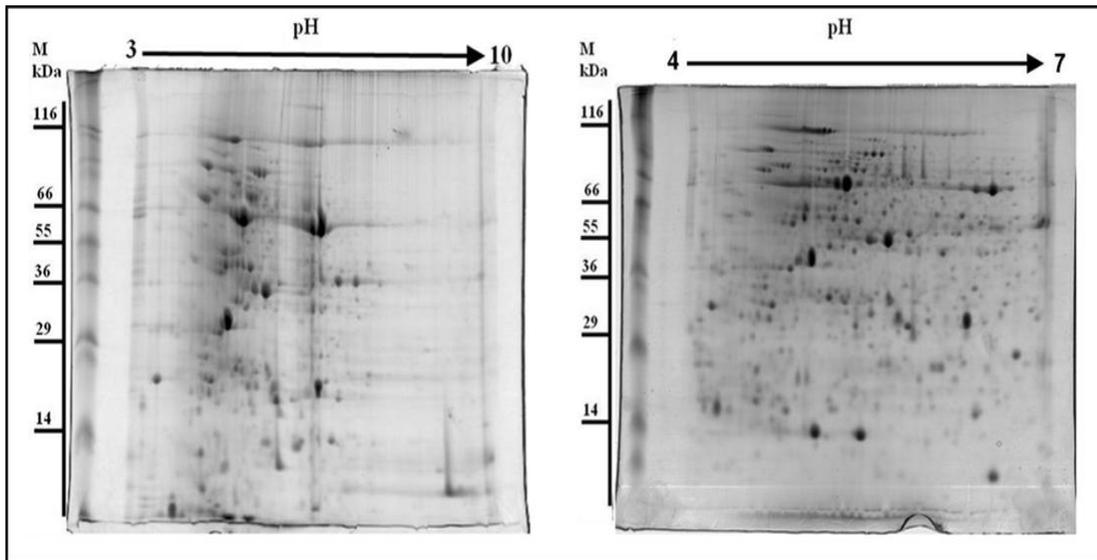
Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão (n=3). Valores indicados com a letra são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

A avaliação dos extratos protéicos obtidos das folhas de cana-de-açúcar utilizando os três métodos de extração foi analisada através de géis 1-D (SDS-PAGE), combinado com coloração Coomassie coloidal. As amostras foram realizadas em duplicata para confirmação de sua reprodutibilidade (**Figura 5**).



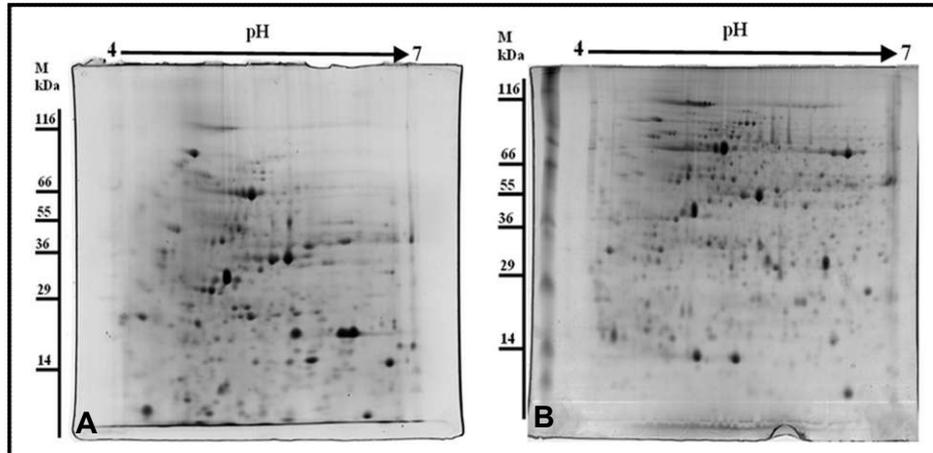
**Figura 5.** Gel unidimensional (SDS-PAGE) de extratos protéicos de folhas de cana-de-açúcar: M (padrão de peso molecular – kDa). 1 e 2: método 1; 3 e 4: método 2; e 5 e 6: método 3.

O perfil das proteínas expressas nas folhas de cana-de-açúcar foi primeiramente caracterizado em gel com primeira dimensão entre pH 3-10. Pela figura 6 foi observado que a maior parte das proteínas estavam concentradas na região de pH 4-7. A separação das proteínas usando fitas IPG com gradiente de pH 4-7 apresentou uma maior resolução que com as fitas de pH 3-10, possivelmente devido à própria característica do material estudado, o qual apresentou um predomínio de proteínas com pI entre 4-7. A comparação entre as duas diferentes faixas de pH pode ser observada na figura 6.



**Figura 6.** Avaliação por eletroforese bidimensional da distribuição das proteínas de folhas de cana-de-açúcar em diferentes faixas de pH. Em (A) foi usado um gradiente de pH linear de 3-10 e em (B) gradiente de pH linear de 4-7.

Os dois métodos de extração, ácida modificada e a fenólica apresentaram um rendimento similar quanto à quantidade de proteínas extraídas das folhas de cana-de-açúcar. Porém quando se realizou uma comparação entre os dois métodos através da eletroforese bidimensional usando fitas IPG de 13 cm com gradiente de pH de 4-7, demonstrado na figura 7, foi observado que a extração fenólica apresentou os melhores resultados.



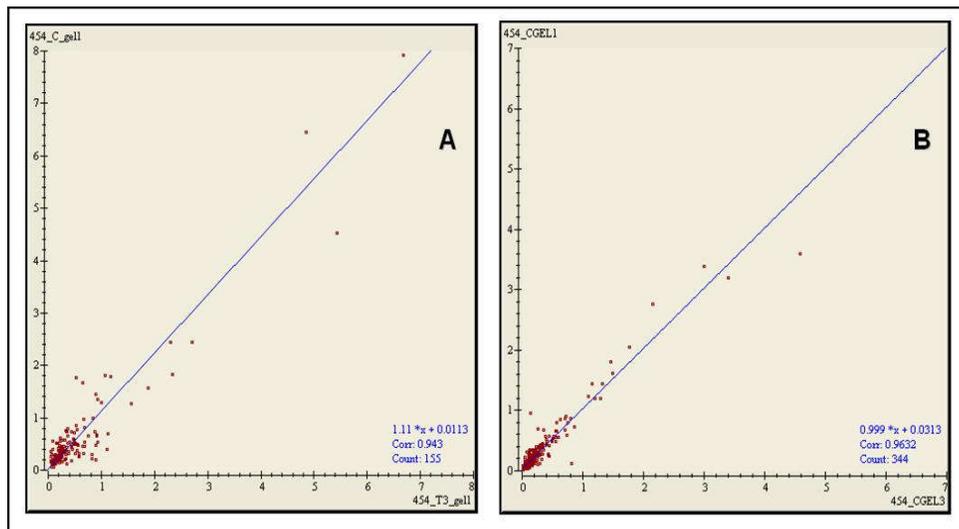
**FIGURA 7:** Separação das proteínas de folhas de cana-de-açúcar. Focalização isoeétrica realizada em gradiente linear de 4-7. A. Método 2 (ácida modificada) e B método 3 (fenólica).

Na extração fenólica não é necessário realizar tratamentos adicionais para eliminar os ácidos nucleicos do extrato, pois estes são separados durante a extração, ficando retidos na fase aquosa a qual é descartada, enquanto que as proteínas ficam na fase fenólica. Durante o processo também são eliminados polissacarídeos e sais. Outro aspecto positivo dessa técnica é o fato da proteólise ser minimizada pela presença do fenol (HURKMAN e TANAKA, 1986).

Segundo Alfenas et al., (1998) um dos problemas encontrados na extração de proteínas e enzimas de plantas é a presença de compostos fenólicos liberados durante a maceração do tecido. Tais fenóis, quando descompartimentalizados, são prontamente oxidados a quinonas por enzimas da própria planta (polifenoloxidasas e peroxidases). Tanto os compostos fenólicos não oxidados quanto as quinonas reagem com as proteínas e inativam as enzimas e na eletroforese podem alterar a mobilidade das moléculas de proteína, resultando em artefatos no gel. Os métodos de extração devem ser desenvolvidos de modo a separar especificamente fenóis de proteínas e, simultaneamente prevenir a oxidação dos compostos fenólicos.

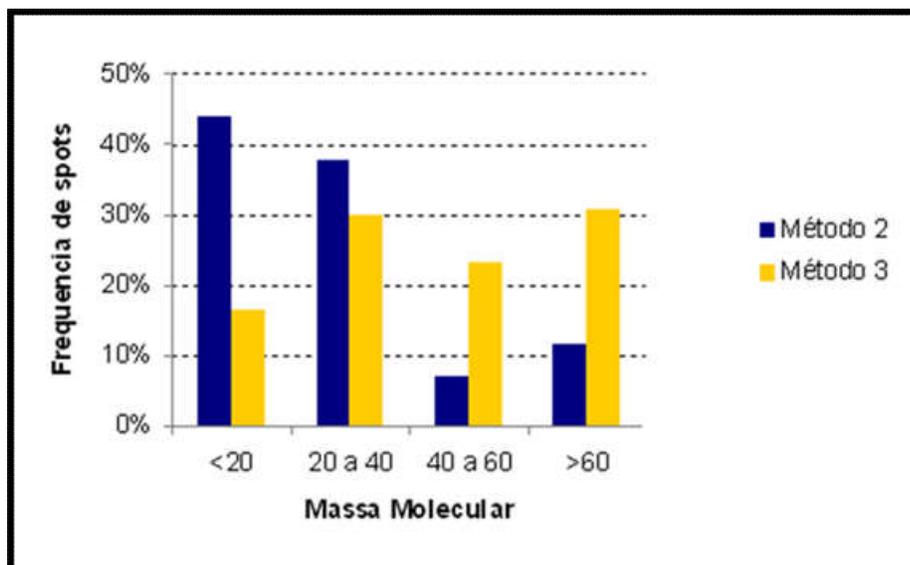
A análise dos géis bidimensionais com gradiente de pH 4-7 através do programa ImageMaster 2D Platinum demonstrou reprodutibilidade nos resultados. Após a detecção automática, foi realizada uma edição manual com correção, adição e remoção dos spots. O método 3 resultou num maior número de *spots* (518) que o método 2 (179), foram encontradas 484 *spots* exclusivos para o método 3 e 145

*spots* exclusivos para a metodologia 2, onde foi possível observar no método 3 proteínas ácidas e básicas e de altos e baixos pesos moleculares, tendo uma maior resolução e menores quantidades de listas horizontais nos géis (**Figura 7**), a reprodutibilidade entre as repetições foi de 0,9632 de correlação linear para o método 3 e 0,943 para o método 2 (**Figura 8**) e para cada ponto no gráfico correspondente a um *spot* foi encontrada correspondência com os outros *spots* das repetições dos géis analisados.

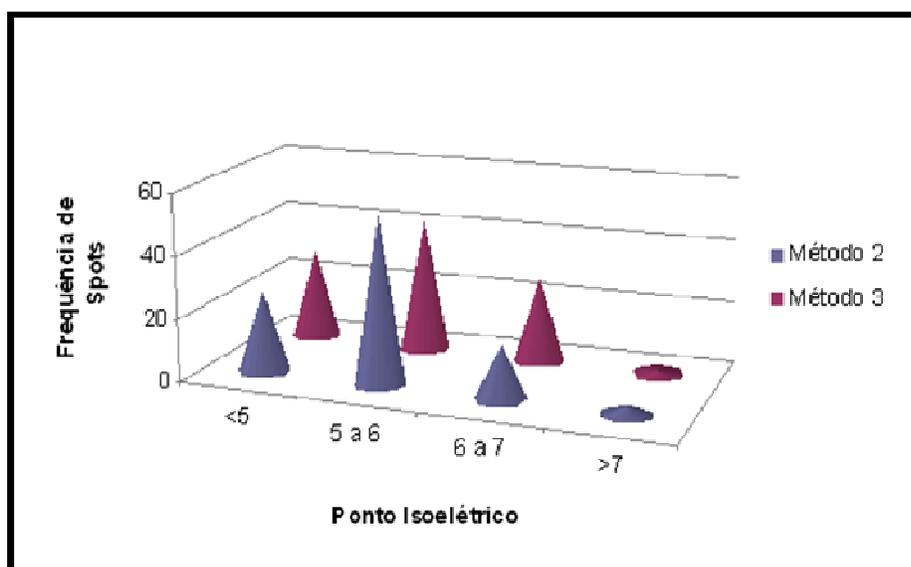


**FIGURA 8:** Gráficos de dispersão de intensidade de “spots” entre as repetições para cada metodologia de extração de proteínas de folhas de cana-de-açúcar. A. Método 2 (ácida modificada). B. Método 3 (fenólica).

Os padrões eletroforéticos, obtidos a partir dos mapas 2-D, foram avaliados nos dois métodos de extração. Para tanto, os géis analisados foram alinhados, visando atribuir identidades comuns entre os *spots* das repetições, e os “spots” presentes nas três repetições foram adicionados aos mapas. No método 3 a maior parte dos *spots* observados apresentaram massa molar (MM) superior a 40 kDa, enquanto para o método 2 a maioria dos spots tiveram massa molar inferior a isso (**Figura 9**). Tanto para o método 3 como para o método 2 predominaram os *spots* com pI entre 5 e 6 (**Figura 10**).

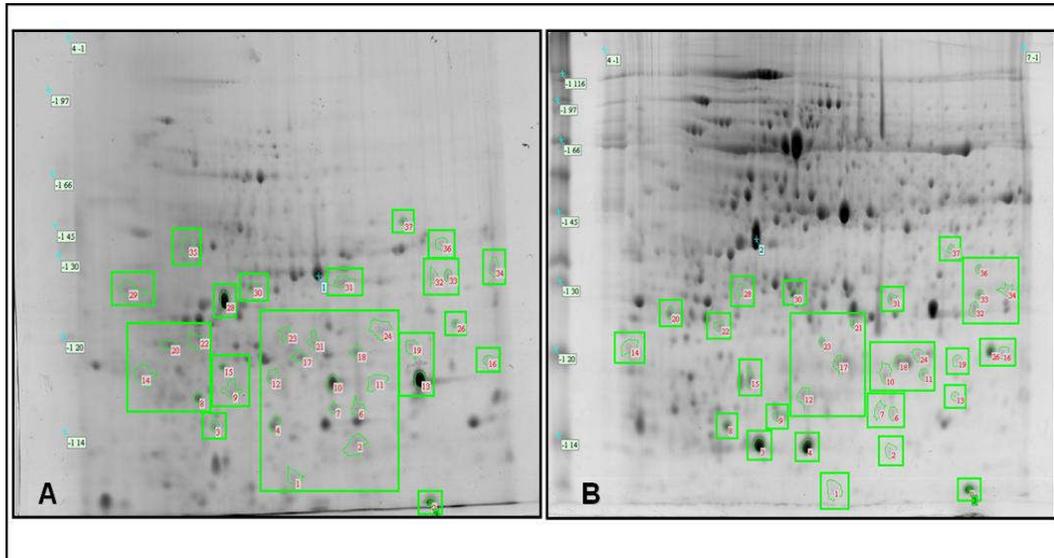


**FIGURA 9:** Gráfico de distribuição dos *spots* de acordo com massa molecular relativa (Mr). Azul: extração utilizando método 2 (ácida modificada), Amarelo: extração utilizando método 3 (fenólica).



**FIGURA 10:** Gráfico de distribuição dos *spots* de acordo com o ponto isoelétrico (pI). Azul: extração utilizando método 2 (ácida modificada), Vermelho: extração utilizando método 3 (fenólica).

34 *spots* foram comuns para ambos os métodos de extração analisados (Figura 11).



**FIGURA 11:** Géis bidimensionais de proteínas de folhas de cana-de-açúcar. (A) *spots* detectados utilizando o método 2 (ácida modificada). (B) *spots* detectados utilizando o método 3 (fenólica) mostrando os *spots* similares para os dois métodos de extração.

Uma das maiores desvantagens da metodologia que emprega a precipitação por TCA como no método 2 é a dificuldade de ressolubilização das proteínas (NANDAKUMAR et al., 2003). Métodos que utilizam TCA (método ácido) para extração de proteínas é ainda o método mais comum entre os métodos de extração utilizados, e alguns trabalhos têm mostrado que de acordo com o tecido analisado, ele é um dos principais métodos para 2-D (ZHOU et al., 2006). Segundo Carpentier *et al.*, (2005) observou-se que há uma grande possibilidade de perda de proteínas de alto peso molecular utilizando o método de precipitação por TCA e um grande enriquecimento de proteínas de baixo peso molecular. Resultados similares foram encontrados para tecidos de folha e cana-de-açúcar como mostrado na figura 7A.

Uma das limitações no número de *spots* detectados no gel é a técnica adotada no momento da revelação das proteínas. A técnica deve ter reprodutibilidade e alta sensibilidade, permitindo a visualização de um maior número possível de proteínas e ao mesmo tempo ser compatível com o método de identificação usado, ou seja, a espectrometria de massas (CANDIANO et al., 2004;

GÖRG et al., 2004). O uso do corante *Coomassie Brilliant Blue* G-250 demonstrou repetibilidade dos géis e compatibilidade com a espectrometria de massas. Segundo Candiano et al., (2004), o método apresenta uma sensibilidade que permite detectar proteínas com quantidades de até 1ng. O método 3 foi o mais eficiente na remoção de substâncias interferentes e resultou em géis de maior qualidade. Resultados similares têm sido descritos também em outras espécies vegetais como maçã, pêra e batata (CARPENTIER, 2005).

Já em tecidos como banana, maçã, tomate e batata, utilizando os mesmos métodos testados nesse trabalho, a utilização da extração por fenol foi à metodologia mais eficiente em tecidos de plantas que possuem altos teores de interferentes. O método 3 foi adaptado para esses tipos de tecidos recalcitrantes, primeiramente proposto por HURKMAN e TANAKA (1986), pela adição de sacarose (SARAVAN e ROSE, 2004; e CARPENTIER et al. 2005). Segundo Saravanan e Rose (2004), o extrato utilizando o protocolo TCA/acetona geralmente contém menos proteínas de altos pesos moleculares, enquanto que com o método de extração fenol/acetato de amônio geravam extratos com proteínas bem resolvidas inclusive de altos pesos moleculares. Eles concluíram que a extração com fenol é o método de escolha para tecidos vegetais recalcitrantes.

Normalmente, existem duas metodologias para remoção de contaminantes: a primeira seria a remoção dos contaminantes antes da extração de proteína e a segunda etapa seria a remoção após a extração de proteínas. Folhas de cana-de-açúcar contêm altos níveis de compostos interferentes e a homogeneização de tecido foliar, por um tampão específico seguida pela precipitação por solventes orgânicos, sempre resulta em um material pastoso de difícil processamento. Portanto, neste caso é necessária a remoção completa dos contaminantes antes da extração de proteínas.

Dupont et al., (1988) demonstraram que glicoproteínas com pesos moleculares entre 100kDa a 200kDa estavam ausentes após extração apenas com fenol, mas presente após extração na presença de SDS. A maioria dos problemas pode ser atribuída à migração das proteínas na focalização isoeétrica (GÖRG, 2000).

A combinação de TCA e acetona são comumente usadas para a precipitação de proteínas e remoção de contaminantes durante a preparação para a eletroforese 2-D. No entanto, estes protocolos com preparações utilizando TCA/acetona

geralmente exigem várias lavagens até que o tecido torna-se incolor tornando um processo bastante laborioso e dispendioso. Além disso, a exposição prolongada a um pH baixo pode levar a degradação das proteínas ou sua modificação (WANG, 2003).

Outro passo importante no trabalho foi à introdução da lavagem com metanol, pois o metanol é muitas vezes usado pra extrair compostos fenólicos (CROZIER, et al., 1997). Além disso, uma lavagem com metanol na presença de acetato de amônio pode neutralizar resíduos de TCA e um aumento de pH acima de sete, facilitando a extração de proteínas por fenol.

Em todas as análises, a utilização do método 3 facilitou a extração de amostras de proteínas com alta qualidade e adequada para a análise por eletroforese. A qualidade geral dos perfis de proteínas obtidas nos géis de poliácridamida foi satisfatória, como por exemplo, menos borrões e manchas verticais e horizontais nos géis.

A remoção convencional de compostos contaminantes nos extratos protéicos envolve sempre a utilização de solventes orgânicos (como por exemplo, acetona e 10% TCA em acetona) na lavagem desses contaminantes que se encontram misturados no tecido macerado (DAMERVAL, 1986). Uma grande medida para a eficiência da remoção depende, sobretudo, de uma reduzida granulometria do pó do tecido. Com base em nossa experiência, quanto mais reduzida, a remoção dos contaminantes torna-se mais eficiente.

Apesar de o método TCA ser amplamente utilizado em análise 2-D para diferentes partes das plantas, como órgãos, células e tecidos e espécies de plantas, tais como *Arabidopsis*, arroz, soja, milho (ASKARI et al., 2006; DOOKI et al., 2006; PLOMION et al., 2006; SAUER et al. 2006; YAN et al., 2006; LI et al., 2007; YIN et al., 2007; XU et al., 2008). Nossos resultados indicam que as etapas de maceração, homogeneização por duas horas utilizando um tampão contendo TCA/acetona gelada e logo em seguida esse material ser liofilizado se mostrou muito eficiente para a remoção de contaminantes e um método de extração ideal para extrair proteínas de folhas de cana-de-açúcar, Portanto, a extração com fenol/SDS foi realizada para minimizar ainda mais a presença desses contaminantes nos extratos de proteínas.

Estes resultados mostram que o método 3 (fenólico) tem uma alta capacidade de limpeza e seletividade, já que o fenol é um agente que reduz a dissociação de

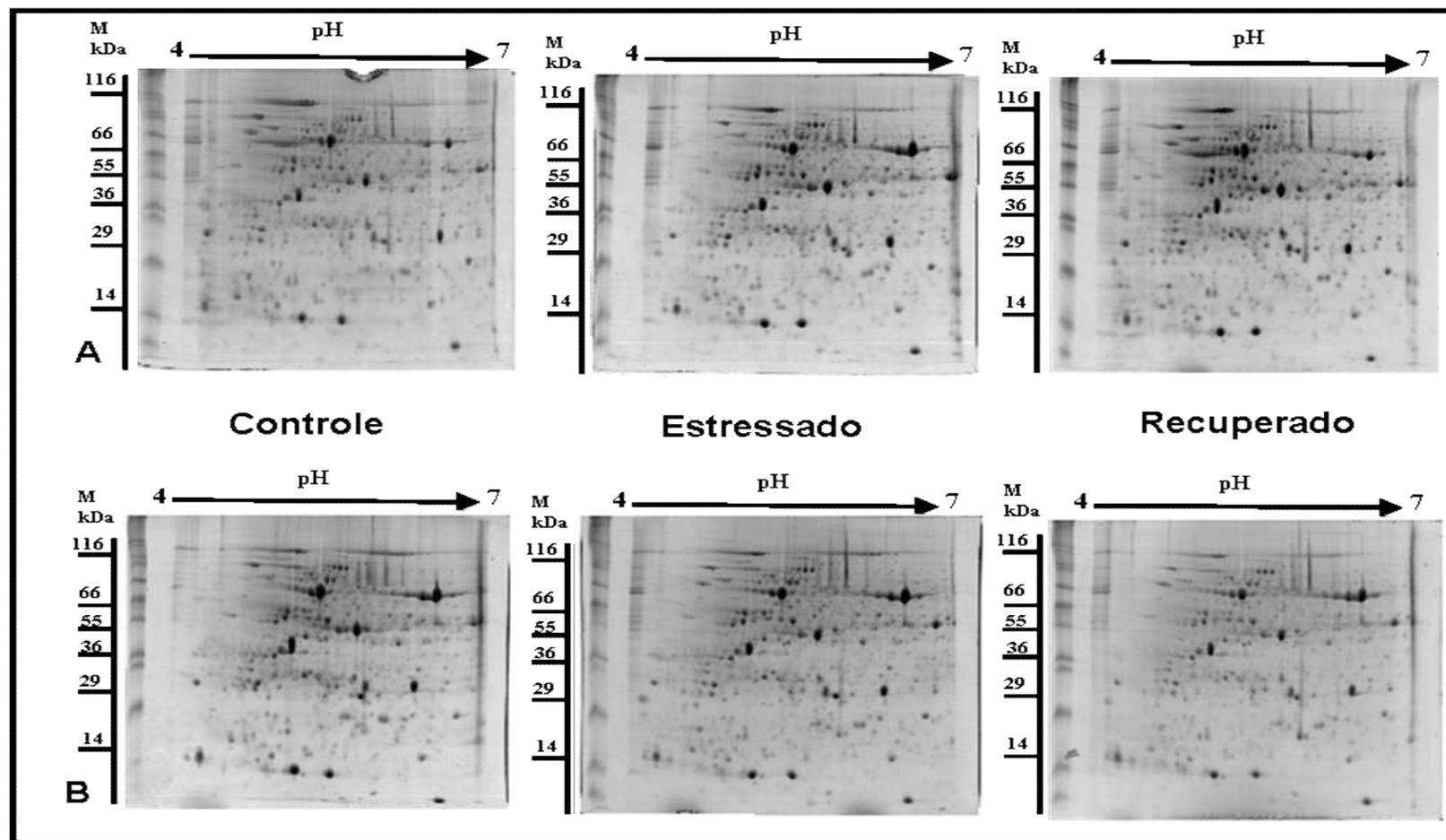
interações moleculares entre proteínas e outros materiais (CARPENTIER et al., 2005).

A perda de proteínas é inevitável. No entanto, este estudo demonstra que a precipitação é absolutamente necessária quando se lida com tecidos recalcitrantes. Também foi observado pelos protocolos utilizados, que esses métodos servem como padrão para extração de tecidos vegetais recalcitrantes e a extração otimizada com fenol é mais eficiente para remoção de substâncias interferentes, o que resultou em géis de alta qualidade.

O objetivo principal dos métodos utilizados foi à busca de um protocolo que, além de extrair grandes quantidades de proteínas, fosse homogêneo, ou seja, um método adequado para extração de proteínas de baixo e alto peso molecular, bem como de proteínas ácidas e básicas.

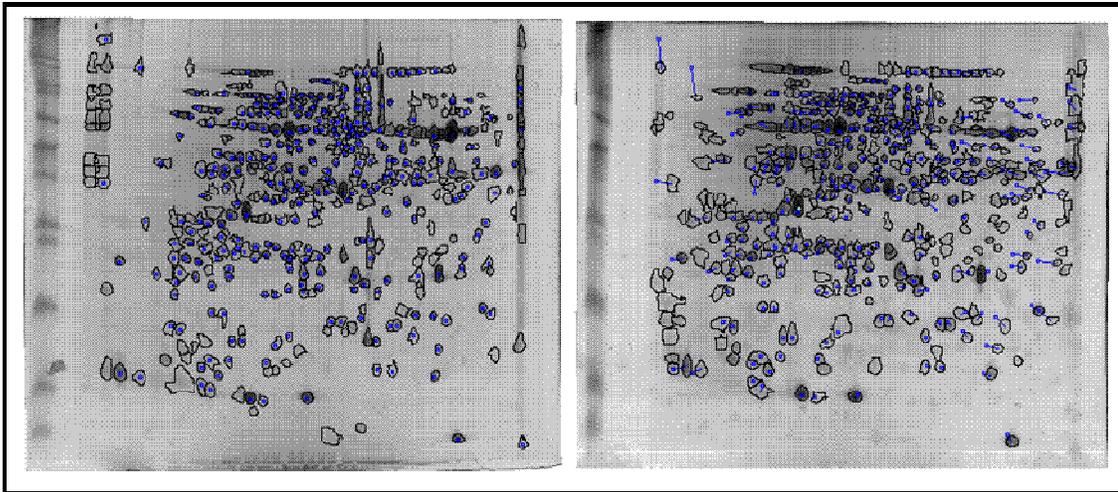
### **5.3. Análise proteômica dos genótipos submetidos ao estresse hídrico**

Os géis 2-D que representam os perfis protéicos das amostras dos dois genótipos nas condições controle, estresse hídrico e recuperação estão mostrados na figura 12. Mais de 500 *spots* foram detectados em cada gel por Coomassie blue e as proteínas presentes no gel apresentam massa molecular aparente variando, aproximadamente, entre 6,5 e 116 kDa e ponto isoelétrico entre 3,6 e 7,07.



**Figura 12.** Géis bidimensionais de amostras de extratos protéicos totais de folhas de cana-de-açúcar utilizando fitas de faixa de pH 4-7. **A** – Genótipo sensível (RB72454); **B** – Genótipo tolerante (RB72910). Tratamentos: controle, estresse e recuperação.

A Figura 13 mostra a orientação dos vetores gerados a partir do pareamento do mesmo *spot* entre o gel de referência e um dos géis analisados. Algumas regiões do gel apresentam pequenas variações na migração dos *spots*, uma vez que para essas os vetores podem ser observados com proporções maiores. Observa-se que houve grande reprodutibilidade entre as repetições, o que também pode ser observado pelo número de *spots* detectados em cada gel: 386 343 e 327. Esses desvios e ausência de *spots* são causados principalmente por variações na focalização isoeétrica e na eletroforese, constantemente descritas na literatura e inerentes à técnica (GÖRG, 2004).



**Figura 13.** Orientação dos vetores representando o alinhamento dos *spots* em relação ao gel referência.

Todos os géis confeccionados e utilizados nesta análise foram preparados juntamente, a fim de se minimizar as variações decorrentes da focalização isoeétrica, da migração na segunda dimensão e também da coloração. Pois segundo Görg, (2004) as pequenas diferenças de migração entre os géis, refletidas em variações discretas nas massas moleculares e *pI*s das proteínas, podem ser aceitas como normais e inerentes da técnica 2-DE, uma vez que essas pequenas variações não têm como ser evitadas.

Outra ferramenta utilizada nesta análise foi à detecção automática de *spots* em cada gel. O programa geralmente entende como *spot* qualquer mancha, bolhas de ar ou água, e rastros de proteínas que não foram bem focalizadas. Foi necessário

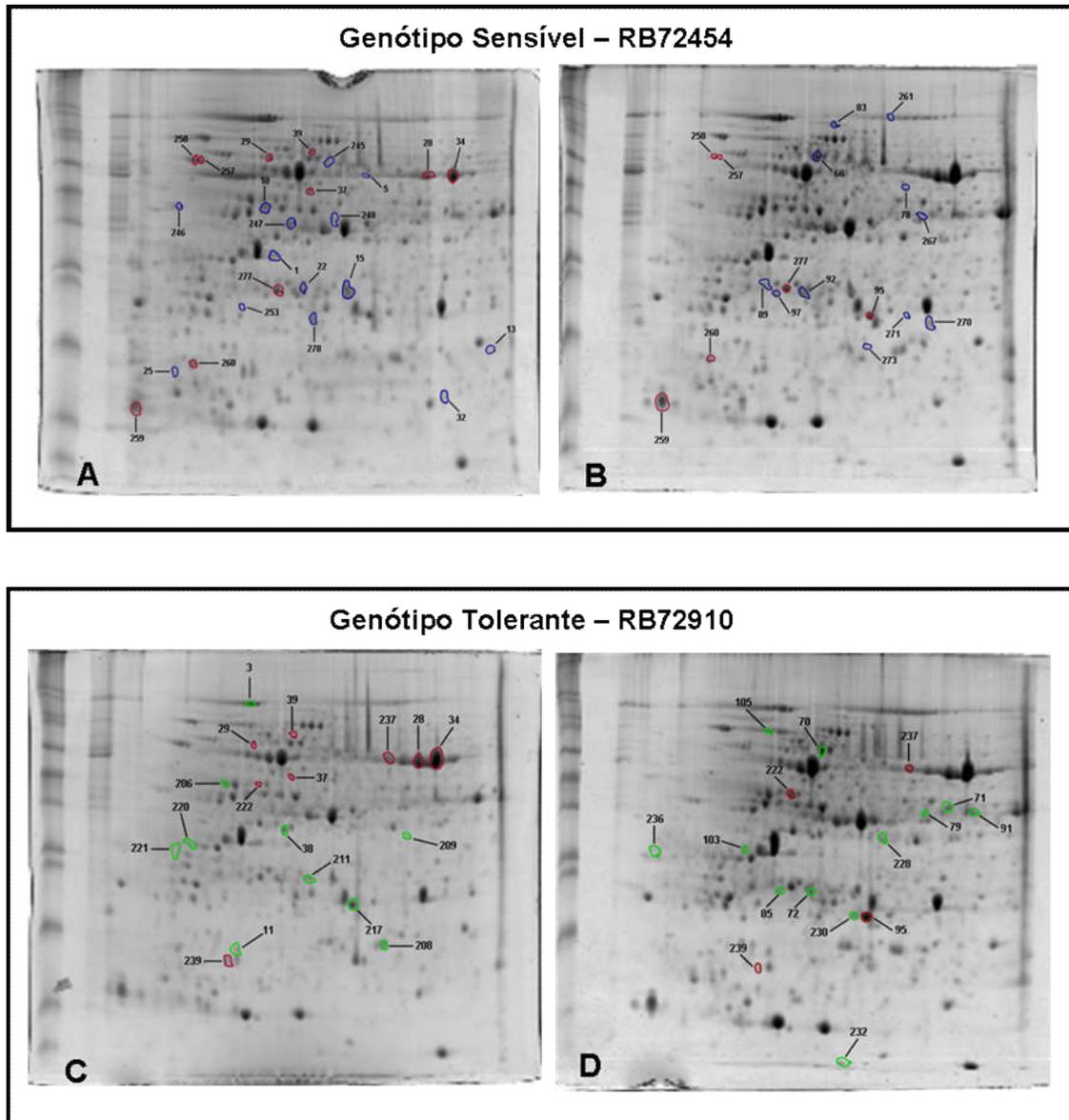
realizar uma edição manual, que consiste em adicionar e apagar *spots* tendo como base a imagem impressa dos géis.

As imagens dos géis analisados pelo programa *ImageMaster Platinum 2D* geralmente gera alguns falsos *spots*, necessitando de uma intervenção de edição manual. Como o programa considera o total dos *spots* gerado igual a 100%, no momento da edição manual, os falsos *spots* foram removidos, reduzindo esse percentual.

Os volumes dos *spots* foram normalizados de acordo com a ferramenta do programa *ImageMaster Platinum 2D*. Os *spots* que não apresentaram repetibilidade foram desconsiderados. Cada *spot* normalizado representa a porcentagem que a proteína ocupa no gel. Ou seja, proteínas abundantes como, por exemplo, a subunidade maior da Rubisco representa normalmente de 40-50% das proteínas presente no gel. Esse valor em porcentagem é gerado a partir da interpolação entre a delimitação física gerada pelo *spot* associada à sua intensidade, gerada em *pixels*.

A comparação dos *spots* diferencialmente expressos entre controle e tratamento dos genótipos estudados foi realizada com base em um gel de referência adotado. O gel de referência foi utilizado para o procedimento de alinhamento. Nessa ferramenta do programa, o gel de referência se sobrepõe aos géis controle e tratamentos alinhando os *spots*. O alinhamento foi gerado tanto automaticamente como manualmente em decorrência das deformidades intrínsecas de cada gel.

As comparações entre todos os tratamentos foram analisadas nas mesmas condições fazendo uso dos mesmos parâmetros de tonalidade, contraste e nitidez. A análise entre os géis apresentaram *spots* idênticos para os dois genótipos contrastantes, *spots* exclusivos, e *spots* que apresentaram alterações no nível de expressão diferencial de pelo menos de 1,5 vezes nos géis para os diferentes tratamentos. Foram realizadas comparações entre os géis dos dois genótipos nos tratamentos (controle, estresse e recuperação) e a retirada dos *spots* para a identificação foi realizada com base na análise pelo software com uma confirmação visual, privilegiando aqueles que apresentaram coloração mais intensa ou que estavam mais bem definidos. Na figura 14 estão representadas as proteínas identificadas por espectrometria de massas nos diferentes tratamentos para os dois genótipos.



**Figura 14.** Géis 2-DE de folhas de cana-de-açúcar dos genótipos contrastantes. Foram selecionados os *spots* diferencialmente expressos ou onde a abundância foi de no mínimo 2 vezes maior ou menor sob o efeito do estresse hídrico utilizando ANOVA ( $p \leq 0,05$ ). A e B – *Spots* em azul (proteínas exclusivas do genótipo sensível nos tratamentos controle e estresse, respectivamente), C e D – *Spots* em verde (proteínas exclusivas do genótipo tolerante nos tratamentos controle e estresse, respectivamente). Os spots em vermelho correspondem aos spots com diferença na expressão entre os diferentes genótipos e tratamentos.

#### 5.4. Identificação das proteínas por espectrometria de massas

Visando a identificação de alterações no metabolismo de cana-de-açúcar durante o processo de estresse hídrico, foram selecionados 180 *spots* diferencialmente expressos e mais abundantes em % de volume dos mapas 2-DE presentes nos genótipos tolerante e sensível, quando comparados os diferentes tratamentos (controle, estresse e recuperação). Os *Spots* maiores e muito intensos foram retirados de apenas uma repetição. Os menos intensos e menores foram retirados das 3 repetições, a fim de aumentar a quantidade da proteína a ser analisada, e conseqüentemente, as possibilidades de identificação pela espectrometria de massas.

Os *spots* selecionados a identificação foram aqueles que apresentaram repetibilidade entre os três géis e expressão diferencial nos tratamentos avaliados. Utilizando o modo automático do equipamento MALDI-TOF-TOF MS (Autoflex III Smartbeam, Bruker Daltonics Handelsregister, Bremen, Germany) foram identificados 80 *spots* com estatística significativa. Os demais não produziram espectros de massa onde fosse possível obter seqüências de peptídeos necessários para a identificação. Os 80 *spots* identificados estão listados na Tabela 3.

A identificação de proteínas, muitas vezes exclusivas de um determinado tecido ou espécie, depende da disponibilidade de uma base de dados específica e pode revelar muitas vezes, proteínas ainda desconhecidas e conseqüentemente a identificação de novos genes, contribuindo assim para elucidação de diversos processos celulares (GIORGIANNI, 2003).

A espectrometria de massas, utilizada para o sequenciamento de peptídeos originados pela digestão tripídica de proteínas previamente separadas por eletroforese bidimensional, constitui uma estratégia eficiente para conhecer o conjunto de proteínas expressas em um tecido, sob determinadas condições bióticas e abióticas. Entretanto, grande parte das proteínas submetida à digestão e espectrometria de massas, não tem sua seqüência de aminoácidos determinada ou detectada, provavelmente devido à baixa concentração dos peptídeos gerados (SOUZA, 2006).

Aliado a este fator, outras limitações inerentes à técnica podem contribuir para a baixa eficiência de recuperação dos peptídeos oriundos dos *spots*. Além disso, é difícil prever quantas proteínas possam compor um *spot*, visto que produtos

protéicos de múltiplos genes podem migrar para as mesmas coordenadas de um gel. Gion *et al.* (2005) verificaram que 15,4% dos *spots* identificados por espectrometria de massas correspondiam a misturas de proteínas. Gygi *et al.* (2000) observaram produtos de seis genes de levedura presentes em um único *spot* após eletroforese bidimensional. Porubleva *et al.* (2001) observaram que a presença de várias proteínas em um mesmo *spot* pode ser em função da degradação proteolítica e fragmentos proteolíticos não vão gerar peptídeos tripídicos suficientes para a análise por MS/MS, constituindo outro fator que pode contribuir para o insucesso da identificação de uma proteína. Em nosso experimento a espectrometria de massas não identificou nenhum *spot* múltiplo, confirmando o sucesso na separação das proteínas de tecidos de folhas de cana-de-açúcar, utilizando gradiente de pH de 4-7 e segunda dimensão de 12,5% de acrilamida.

Entre as proteínas identificadas, um grande número apresentou identidade com sequências de proteínas de espécies de plantas como *Zea mays* e *Sorghum bicolor*. Estas espécies apresentam um grande número de sequências de proteínas e genes depositadas em bancos de dados públicos como o NCBI, e são geneticamente relacionadas à cana-de-açúcar. Desta forma a homologia indica que essas proteínas são altamente conservadas entre essas espécies não-lenhosas.

Costa *et al.* (1999), afirmaram que, embora pequenos trechos de determinados peptídeos possam revelar elevada conservação, o resultado pode ser bem diferente quando se trata da sequência completa da proteína. No presente trabalho, entretanto, a maioria das proteínas foi identificada preferencialmente com pelo menos duas sequências peptídicas, proporcionando maior cobertura da sequência completa, o que resultou em maior confiabilidade da identificação. Foram identificadas 38 *spots* que apresentaram homologia com proteínas ou cDNAs de *S. officinarum* já depositados.

A cana-de-açúcar teve seu genoma funcional seqüenciado (VETTORE *et al.*, 2001) com 237.954 sequências de ESTs (expression sequence tags) como potenciais mRNA. Apesar de todo este volume de sequências, em nosso trabalho encontramos 42 *spots* para a cana-de-açúcar, destacando a importância da proteômica como ferramenta para a identificação de novas proteínas.

A estratégia de identificação de proteínas por similaridade de sequências validou todas as identificações sugeridas pelo MASCOT, e permitiu a identificação de 14 novas proteínas ainda não descritas em cana-de-açúcar como as proteínas

*Oxygen evolving complex 1* (spots 01 e 103), *Triosephosphate isomerase* (spots 22 e 92), *Ubiquitin – conjugating* (spots 32), *Phosphoglycerate mutase* (spots 39), *Fructose biphosphate aldolase cytoplasmic* (spots 71, 141, 247 e 277), *6-phosphogluconate dehydrogenase* (spots 78), *Heat shock 70kDa* (spots 105 e 145), *Frutokinase-1* (spots 159), *Ascorbate peroxidase* (spots 211), *3-beta hydroxysteroid dehydrogenase* (spots 220 e 232), *Ferredoxin NADP reductase* (spots 228), *Chlorophyl a-b* (spots 230 e 278), *Nucleic acid binding protein1* (spots 236), *Auxin* (spots 270). Estas proteínas tiveram sua expressão induzida ou reprimida nos genótipos submetidos ao estresse hídrico.

Trabalho realizado por Jangpromma et al. (2010) utilizando duas variedades cultivadas na Tailândia de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico identificaram por espectrometria de massas 22 proteínas, dentre essas proteínas algumas tiveram similaridade com o nosso trabalho, tais como *Rubisco*, *Ferredoxin*, *ATP synthase*, *Actin*, *NADP-dependent malic enzyme*, *Ubiquitin* essas proteínas tiveram sua expressão aumentada ou diminuída quando submetido ao estresse hídrico.

Genes encontrados no transcriptoma de cana-de-açúcar foram incluídos em categorias funcionais de acordo com a homologia da função de proteínas conhecidas, estas categorias são classificadas em processos celulares, fotossíntese, bioenergética, transdução de sinal celular, crescimento, resposta ao estresse, transporte e proteínas desconhecidas ou categorias não classificadas (RODRIGUES et al., 2009).

Tem-se observado que em muitos casos não existe uma correlação direta entre a expressão do mRNA e o nível protéico, sendo necessária sua avaliação experimentalmente (ZHANG et al., 1997, GRIFFIN et al., 2002). Através da proteômica é possível determinar a localização do produto de um gene que muitas vezes é impossível de ser obtido a partir da sequência do DNA; estudar mecanismos como a regulação de proteínas funcionais por proteólise e sua influência na regulação gênica; a interação entre proteínas e a composição molecular de estruturas celulares como organelas podem ser determinadas apenas no nível protéico (KALUME et al., 2003).

Na avaliação de expressão no nível do transcriptoma podem ser fornecidas informações importantes sobre a carga genética transcrita de um organismo em um determinado momento, entretanto, ela não reflete diretamente a expressão das

proteínas (CHEN e HARMON, 2006). Após a transcrição, podem ocorrer modificações pós-transcricionais e pós-traducionais, com alteração da conformação espacial de proteínas e que resultam em classes protéicas que bioquímica e estruturalmente podem desempenhar diferentes funções metabólicas (CHEN e HARMON, 2006).

**Tabela 3** – Proteínas das folhas de cana-de-açúcar separadas com um gradiente de pH 4-7 por eletroforese bidimensional e identificadas por espectrometria de massas (Maldi-tof MS/MS).

Spot	pI/MM	Sequência de Peptídeos	Proteína Provável	Acesso	Espécie
01	5.58/35249	<b>K.DGIDYAAVTVQLPGER.V</b>	Oxygen-evolving complex protein 1	gi 739292	<i>Spinacia oleracea</i>
103	5.13/26603	<b>K.DGIDYAAVTVQLPGER.V</b>	Oxygen-evolving complex protein 1	gi 739292	<i>Oryza sativa</i>
05	5.32/21051	<b>K.TFQGPPHGIEVER.D</b>	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase/oxygenase (grande unidade)	gi 93213554	<i>Bryopsis pennata</i>
10	5.10/27728	<b>R.IPVIVTGNDFSTLYAPLIR.D FYWAPTR</b>	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase/oxygenase activase	gi 47176692	<i>Zantedeschia hybrid cultivar</i>
28	6.46/51143	<b>R.VTPQPGVPAEEIGA AVAAESSTGTWTTVWTDGLTSL DR.Y</b>	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase/oxygenase (grande unidade)	gi 57977165	<i>Aspidistra sutepensis</i>
29	5.42/61969	<b>K.SSEFLYVVEGMQFDR.G K.AAVEEGIVGGGCTLLR.L</b>	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase/oxygenase (grande unidade)	gi 223948025	<i>Saccharum officinarum</i>

Continuação...

Spot	pl/MM	Sequência de Peptídeos	Proteína Provável	Acesso	Espécie
34	5.56/28408	<b>R.MTPQPGVPAEEAGAAVAEESVGTWTTVWTDGLTS LDR.Y</b>	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase/oxygenase	gi 1881646	<i>Vittaria appalachiana</i>
214	8.77/19332	<b>K.ELQEAIASYPDAYVR.I</b>	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase/oxygenase (pequena unidade)	gi 34971132	<i>Saccharum officinarum</i>
223	8.77/19332	<b>K.ELQEAIASYPDAYVR.I</b>	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase/oxygenase (pequena unidade)	gi 34971132	<i>Saccharum officinarum</i>
237	7.33/45407	<b>K.TFQGPPHGNQVER.D</b>	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase/oxygenase (grande unidade)	gi 20467341	<i>Picea asperata</i>
264	6.13/52118	<b>R.GGLDFTKDDENVNSQPFMR.W R.FVFC AEAIYK.A R.VALEACVKAR.N</b>	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase/oxygenase (grande unidade)	gi 34956300	<i>Touroulia guianensis</i>
265	6.33/49077	<b>R.GGLDFTKDDENVNSQPFMR.W R.FVFC AEAIYK.A R.DPGLLLHIHR.A</b>	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase/oxygenase (grande unidade)	gi 33462128	<i>Saccharum officinarum</i>
224		<b>K.ELQEAIASYPDAYVR.I</b>	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxylase/oxygenase (pequena unidade)	gi 34971132	<i>Saccharum officinarum</i>

Continuação...

Spot	pI/MM	Sequência de Peptídeos	Proteína Provável	Acesso	Espécie
03	5.5/103035	<b>R.AVFNSWESPR.A</b> <b>K.LYGEFLINAQGEDVVAGIR.T</b> <b>R.LLDPPLHEFLPEGNVEEIVR.E</b>	Piruvato ortofosfato dikinase	gi 108796050	<i>Saccharum officinarum</i>
152	5.50/103035	<b>R.AVFNSWESPR.A</b> <b>K.LYGEFLINAQGEDVVAGIR.T</b>	Piruvato ortofosfato dikinase	gi 108796050	<i>Saccharum officinarum</i>
22	6.45/32626	<b>K.LIACIGELLEER.E</b> <b>K.VATPEQAQEVHAAVR.D</b>	Triose fosfato isomerase	gi 242049978	<i>Sorghum bicolor</i>
92	5.53/27278	<b>K.VIACVGETLEQR.E</b> <b>K.VATPAQAQEVHASLR.D</b> <b>K.TNVSPEVAESTR.I</b>	Triose fosfato isomerase	gi 34937104	<i>Dimocarpus longan</i>
25	4.90/10838	<b>K.ESLGLGDDVLLSDGNLELTR.A</b>	Tioredoxina	gi 56182370	<i>Saccharum officinarum</i>
240	8.70/19733	<b>K.VNTDESPNVASTYGIR.S</b>	Tioredoxina	gi 34923826	<i>Zea mays</i>
32	6.74/17266	<b>R.LLSEPAPGISASPSEENMR.Y</b>	Ubiquitina conjugada	gi 18394416	<i>Arabidopsis thaliana</i>
37	6.20/50972	<b>K.KYDEIDAAPEER.A</b> <b>R.HSPFFPGYRPFYMR.T</b> <b>K.MIVQLIQPVACEQGM.R.F</b>	Elongation factor Tu domain II	gi 223948863	<i>Zea mays</i>

Continuação...

38	5.69/32831	<b>K.ILVVGGTGYLGR.H R.FFPSEFGLDVDR.T</b>	Isoflavone reductase	gi 34918026	<b>Saccharum officinarum</b>
151	5.69/32831	<b>K.ILVVGGTGYLGR.H R.FFPSEFGLDVDR.T K.YTTVDEYLN.R.F</b>	Isoflavone reductase	gi 35954550	<i>Saccharum officinarum</i>
39	5.29/60763	<b>K.ESFESGTLHLIGLLSDGGVHSR.L R.YLVSPPEIDR.T</b>	Phosphoglycerate mutase	gi 551288	<i>Zea mays</i>
66	6.23/69904	<b>R.NVQVICVTDGER.I K.LLNDEFYIGLR.Q</b>	NADP-dependent malic	gi 242051769	<i>Sorghum bicolor</i>
70	6.42/65234	<b>K.LLNDEFYIGLR.Q</b>	NADP-dependent malic	gi 115420	<i>Phaseolus vulgaris</i>
98	6.23/69904	<b>R.NVQVICVTDGER.I K.LLNDEFYIGLR.Q K.DLVAYAESCMYSPVYR.N</b>	NADP-dependent malic	gi 36076501	<i>Saccharum officinarum</i>
71	7.56/38214	<b>K.TSDGTPFVDVIR.A K.LEVLKPWTLSFSFGR.A K.ENVAAAQATFLVR.C</b>	Fructose biphosphate aldolase cytoplasmic	gi 242093550	<i>Zea mays</i>
141	7.56/43134	<b>K.GLVPLAGSNDESWCQGLDGLASR.S R.YAAISQDNGLVPIVEPEILLDGEHGIER.T</b>	Fructose biphosphate aldolase	gi 118487506	<i>Populus trichocarpa</i>

Continuação...

247	5.47/37974	<b>K.GLVPLAGSNNESWCQGLDGLASR.S</b>	Fructose bisphosphate aldolase	gi 169039	<i>Pisum sativum</i>
277	176/41808	<b>K.EAAWGLAR.Y K.AAQDALLR.A R.EAAYYQQGAR.F</b>	Fructose bisphosphate aldolase	<u>ACG36798.1</u>	<i>Zea mays</i>
72	7.71/26447	<b>K.TTGGILLPTTAQSKPQGGEVVAVGEGR.I</b>	Chaperonin	gi 15242045	<i>Arabidopsis thaliana</i>
154	5.12/61150	<b>K.DLGLLVENATEEQ LGTAR.K</b>	Chaperonin	gi 35256469	<i>Saccharum officinarum</i>
78	6.24/53204	<b>K.WTVQQAELSVAAPTIEASLDSR.F K.GWGLNLGELAR.I</b>	6-phosphogluconate dehydrogenase	gi 162463403	<i>Zea mays</i>
79	6.46/36614	<b>R.VPTVDVSVDLTVR.I K.LVSWYDNEWGYSNR.V</b>	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	gi 120670	<i>Zea mays</i>
91	6.67/36605	<b>R.VPTVDVSVDLTVR.T K.GIMGYVEEDLVSTDFV GDSR.S K.LVSWYDNEWGYSNR.V</b>	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	gi 33457896	<i>Saccharum officinarum</i>
267	4.19/11546	<b>K.VISWYDNEWGYSQR.V</b>	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	gi 16852	<i>Zea mays</i>
83	5.86/102463	<b>K.LIGSPPGYVGYTEGGQLTEAVR.R</b>	ATP-dependent Clp protease	gi 399213	<i>Solanum lycopersicum</i>

Continuação...

245	5.87/55713	<b>R.IAQIPVSEAYLGR.V</b> <b>R.EAYPGDVFYLHSR.L</b>	ATP synthase CF1 alpha chain	gi 50812525	<b>Saccharum officinarum</b>
248	5.31/53987	<b>R.GMEVIDTGTPLSVPVGGATLGR.I</b> <b>K.AHGGVSVFGGVGER.T</b> <b>K.VALVYQMNPPGAR.M</b>	ATP synthase CF1 beta subunit	gi 48478778	<i>Saccharum officinarum</i>
256	4.84/26720	<b>K.IFADETVAEFFDNPTVPR.E</b>	ATP synthase delta chain	gi 36062721	<i>Saccharum officinarum</i>
85	7.72/29234	<b>K.AVEVAGCDWIHVDVMDGR.F</b> <b>K.AGADIVSVHCEQTSTIHLHR.T</b>	Ribulose-5-phosphate 3-epimerase	gi 35022682	<i>Saccharum officinarum</i>
97	6.59/26415	<b>K.AVEVAGCDWIHVDVMDGR.F</b> <b>K.AGADIVSVHCEQTSTIHLHR.T</b>	Ribulose-phosphate 3-epimerase	gi 35022682	<i>Saccharum officinarum</i>
89	7.71/35273	<b>R.GAFTAVLSGGSLIQALR.K</b> <b>K.WHVFWDER.V</b>	6-phosphogluconolactonase	gi 35048881	<i>Saccharum officinarum</i>
95	7.11/25327	<b>K.NVRPDYLNNIWK.V</b>	Superoxide dismutase	gi 254030293	<i>Saccharum officinarum</i>
239	5.30/20804	<b>K.GTSEVEGVVTLTQDDDGPTTVNVR.I</b>	Chloroplastic copper zinc superoxide dismutase	<a href="#">BAI50563.1</a>	<i>Saccharum officinarum</i>
260	5.47/37974	<b>K.EVAGAASEILHAASYGK.F</b>	Superoxide dismutase	gi 34955041	<i>Saccharum officinarum</i>
100	5.72/42204	<b>K.IWHHTFYNELR.V</b> <b>K.SYELPDGQVITIGAER.F</b>	Beta actin	gi 34968366	<i>Saccharum officinarum</i>

Continuação...

105	5.07/71137	<b>R.FEELNMDLFR.K</b> <b>K.EQVFSTYSDNQPGVLIQVYEGER.A</b>	Heat shock 70kDa	gi 20559	<i>Petunia hybrida</i>
145	5.07/71137	<b>K.NAVVTPAYFNDSQR.Q</b> <b>R.FEELNMDLFR.K</b>	Heat shock 70kDa	gi 20559	<i>Petunia hybrida</i>
142	5.01/31663	<b>K.LAAALPEGGVLLLENVR.F</b> <b>K.LASVADLYVNDAFGTAHR.A</b>	Phosphoglycerate kinase	gi 33463536	<i>Saccharum officinarum</i>
206	4.93/41994	<b>R.ELVADDEWLNGEFITTVQQR.G</b> <b>K.IVQGLPIDEFSR.K</b>	Phosphoglycerate kinase	gi 1022805	<i>Arabidopsis thaliana</i>
244	4.93/41994	<b>K.LASLADLYVNDAFGTAHR.A</b>	Phosphoglycerate kinase	gi 1022805	<i>Arabidopsis thaliana</i>
159	5.17/27353	<b>R.AAVFHYGSISLIAEPCR.S</b> <b>K.EAGALLSYDPNLR.E</b> <b>K.VQQVDTTGAGDAFVGALLR.R</b>	Frutokinase-1	gi 115441577	<i>Oryza sativa</i>
211	2.11/27314	<b>K.NPAELAHGANAGLDIAVR.L</b>	Ascorbate peroxidase	<u>ACO90196.1</u>	<i>Triticum aestivum</i>
220	5.57/32772	<b>K.YPASGVVLRPGFIYGK.R</b>	3-beta hydroxysteroid dehydrogenase	gi 195642948	<i>Zea mays</i>
232	7.63/32772	<b>K.YPASGVVLRPGFIYGK.R</b>	3-beta hydroxysteroid dehydrogenase	gi 195642948	<i>Zea mays</i>

Continuação...

221	4.76/29758	<b>K.AAQDIALAELAPTHPIR.L</b>	14-3-3-like protein	gi 1345587	<b>Saccharum officinarum</b>
222	5.23/30012	<b>R.SKGDGDYQLATDVSMDDFLWER.I</b>	Malate dehydrogenase	gi 585467	<i>Saccharum officinarum</i>
238	4.18/11173	<b>R.SKGDGDYELATDVSMDDFLWER.I</b> <b>K.GDGDYELATDVSMDDFLWER.I</b>	Malate dehydrogenase	gi 21955924	<i>Saccharum officinarum</i>
228	8.54/41322	<b>K.DPNATIIMLATGTGIAPFR.S</b>	Ferredoxin NADP reductase	gi 729477	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>
230	7.74/26851	<b>K.YPGGAFDPLGFSK.D</b>	Chlorophyll a- b binding protein	gi 20788	<i>Pinus sylvestris</i>
278	7.74/26851	<b>K.YPGGAFDPLGFSK.D</b>	Chlorophyll a-b	<u>ACO06087.1</u>	<i>Triticum aestivum</i>
236	4.25/30123	<b>K.VYVGNLPYDVDSER.L</b> <b>R.IYVGNLPWQVDDSR.L</b>	Nucleic acid binding protein1	gi 162463757	<i>Zea mays</i>
246	4.23/24945	<b>K.IKDNPNEEDCVFR.I</b> <b>K.FYDGMEIQR.A</b> <b>K.APVYGETLEELGR.Y</b>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	gi 35257152	<i>Saccharum officinarum</i>
273	9.58/2765	<b>R.IVIGLYGDDVPQTAENFR.A</b>	Peptidylprolyl cis-trans isomerase	gi 32814886	<i>Saccharum officinarum</i>
253	8.69/24566	<b>R.DTIDLFVER.Y</b> <b>R.YKDQGITVVAGVEAR.G</b>	Adeninephosphoribosyl transferase	gi 35252662	<i>Saccharum officinarum</i>

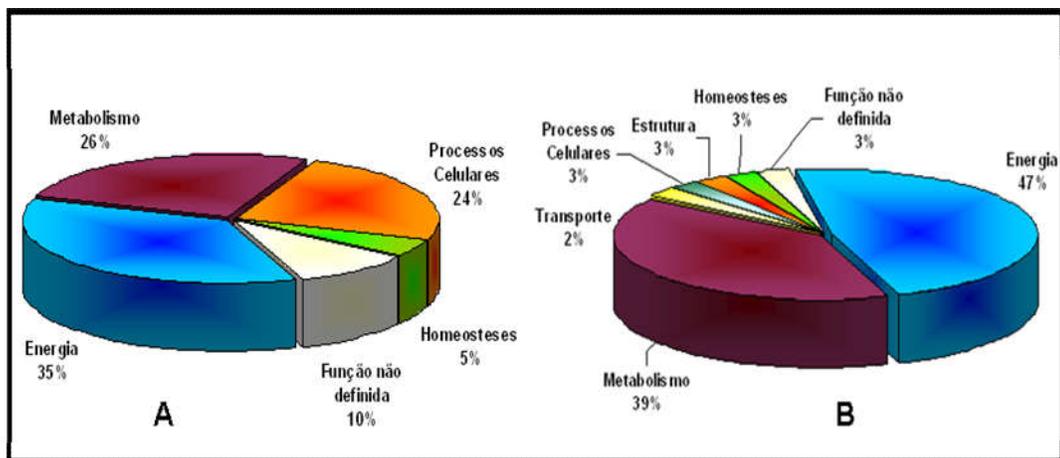
Continuação...

259	5.04/15722	<b>K.NNAGYPHNVVFDEDEVPSGVDAIK.I</b>	<i>Plastocyanin</i>	gi 34970526	<b><i>Saccharum officinarum</i></b>
261	5.91/108931	<b>K.NQSVDLVFTAHTQSAR.R R.GGGPHTLAILSQPPDTINGSIR.V</b>	Phosphoenolpyruvate carboxylase	gi 115578	<i>Saccharum officinarum</i>
266	8.33/55746	<b>R.WFQGTADAVR.Q R.MDYMDVFVQSHR.Q K.ITDSIISHGCFLDNCR.I K.DTVMLGADYYETDAER.R</b>	ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit	gi 35318739	<i>Saccharum officinarum</i>
270	6.01/20553	<b>K.AAVTAPFVGQFPVGNLGLISAAR.L</b>	Auxin-binding protein	gi 195616892	<i>Zea mays</i>
271	5.80/22171	<b>R.WYEIASFPSFFQPR.D</b>	Lipocalin	gi 77744875	<i>Saccharum officinarum</i>
11	9.07/23128	<b>K.ALAIYPPHEGGYEGR.Y</b>	Desconhecida	gi 34976121	<i>Saccharum officinarum</i>
76	5.20/60974	<b>K.LAAAVGVTLGPR.G R.GYISPQFVTNPEK.S</b>	Desconhecida	gi 242032147	<i>Sorghum bicolor</i>
208	6.14/13428	<b>K.VLFVPWVETDFR.T</b>	Desconhecida	gi 169714973	<i>Panicum virgatum</i>
209	6.29/19894	<b>K.ITEEVAAAAVAGAGGYAFHEHHEK.K</b>	Desconhecida	gi 36059217	<i>Saccharum officinarum</i>
217	4.76/52051	<b>K.IGNVPVYTFGFGADYDPTVLNAVAR.N</b>	Desconhecida	gi 34951857	<i>Saccharum officinarum</i>
257	4.78/55751	<b>K.IGNVPVYTFGFGADYDPTVLNAVAR.N</b>	Desconhecida	gi 35953147	<i>Saccharum officinarum</i>

### 5.5. Classificação funcional das proteínas identificadas

Entre os 80 *spots* identificados, 40 *spots* representaram as proteínas identificadas no genótipo sensível e 40 *spots* foram identificados para o genótipo tolerante. As anotações funcionais das proteínas identificadas foram atribuídas com base nos resultados obtidos do BLASTp/NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), com relação ao domínio conservado de cada proteína, informações de banco de proteínas do ExPASy ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) e/ou informações disponíveis na literatura.

As proteínas identificadas foram classificadas de acordo com sua função biológica em categorias funcionais e sua distribuição está representada na Figura 15. As classes mais representativas em ambos os genótipos foram às proteínas envolvidas no metabolismo e energia.



**Figura 15.** Classificação funcional dos spots analisados, separados por eletroforese bidimensional e sequenciados por MS/MS. A – *spots* identificados no genótipo tolerante; B – *spots* identificados no genótipo sensível.

Dentre as proteínas com as sequências identificadas por espectrometria de massas, 6 delas (*spots* 11, 76, 208, 209, 217, 257) apresentaram homologia à proteínas com função ainda desconhecida. Como as identificações são feitas através de buscas em banco de dados e nestes, grande parte das sequências são depositadas a partir de projetos de sequenciamento de ESTs, algumas proteínas encontradas foram sequências até então hipotéticas, e foram classificadas como sendo da categoria “função não definida”.

O maior número de proteínas identificadas está envolvido com a geração de energia, com 35 *spots* relacionados à fotossíntese, metabolismo da glicose e transporte de elétrons. Fazem parte desta categoria as duas proteínas mais abundantes encontradas nas folhas de cana-de-açúcar a *Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* e a *ATP synthase*.

A categoria metabolismo (29 *spots*) está representada pelo segundo maior número de proteínas identificadas nas folhas de cana-de-açúcar. Dentre elas, estão proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, síntese de energia, metabolismo de aminoácidos e metabolismo de nucleotídeos. Na categoria das proteínas relacionadas a processos celulares (12 *spots*) ocorreu a predominância de proteínas envolvidas em mecanismos ligados ao estresse entre elas a proteína *Heat shock protein* (HSP), *Dismutase peroxidase*, *Chaperonas*. Foram também identificados 3 *spots* relacionados com homeostase, 1 *spot* relacionado com estrutura e 1 *spot* relacionado com estrutura do citoesqueleto. A metodologia adotada na extração e separação das proteínas da folha possibilitou identificar proteínas citoplasmáticas (*Triosephosphate isomerase*) e de diferentes organelas como o cloroplasto (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) e mitocôndria (*ATP synthase*, *malate dehydrogenase*).

### 5.5.1. Energia

#### 5.5.1.1. Fotossíntese

Neste grupo foram identificados 19 *spots* correspondendo às proteínas relacionadas à fotossíntese e dentre esses *spots*, 10 *spots* foram identificados como *Ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase* (Rubisco), *Oxygen evolving complex protein 1*, *NADH dehydrogenase*, *Lipocalin*, *Chloroplast a-b* e *Pyruvate orthophosphate dikinase*.

O estresse hídrico pode levar a uma diminuição da taxa de fotossíntese, embora os níveis de tolerância em plantas possam variar em diferentes espécies. Entre os fatores que contribuem para esta redução da fotossíntese levam a planta a desencadear resposta direta ao potencial hídrico induzida pela seca (TIMPÉRIO, 2008).

Foram identificados 10 *spots* (05, 10, 28, 29, 34, 214, 223, 237, 264 e 265) correspondentes as subunidades grandes e pequenas da Rubisco. Esta proteína desempenha papel funcional importante em folhas como uma carboxylase para mediar à assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub>, e como oxygenase para catalisar a primeira etapa da via fotorrespiratória nas plantas.

Dos *spots* identificados 80% (05, 10, 28, 29, 34, 214, 223, 264) foram encontrados nos dois genótipos sob plena irrigação (controle) e 20% dos *spots* (spot 237 e 265) foram encontrados nas plantas submetidas ao estresse. Resultados semelhantes foram obtidos por Nakato et al. (2006), que não observaram superexpressão da enzima, sugerindo que a inibição ou degradação da Rubisco pode ser uma das principais razões para diminuir a taxa da quantidade de clorofila e fotossíntese líquida quando a planta é submetida a estresses ambientais. Nas plantas, o estresse hídrico pode causar a diminuição da síntese de rubisco (VU et al., 1999), a uma perda da atividade (PARRY et al., 2002), ao declínio na atividade da rubisco principalmente devido a proteólise da subunidade grande (HAJHEIDARI et al., 2005; JORGE et al., 2006). No entanto, segundo Xu (2009) relatou que em períodos de estresse hídrico o número de transcritos codificando as grandes subunidades da rubisco aumenta em tabaco e sugeriu que, como a rubisco é uma proteína que participa do caminho cíclico de elétrons, a energia produzida no centro de reações da PSI pode ser dissipada durante o estresse. O papel que a grande subunidade da rubisco exerce em relação à tolerância a seca exige uma investigação mais aprofundada (XU, 2009).

Castro e colaboradores (2005) observaram em análises proteômicas, o aumento da expressão desta enzima e de outras proteínas relacionadas à fotossíntese, quando submeteram *V. vinifera* a estresse causado por um herbicida, sugerindo uma alteração nos efeitos normais da síntese de energia pela planta. Em condições normais, seriam encontrados fragmentos menores desta enzima em géis bidimensionais (CASTRO et al., 2005).

A rubisco é uma enzima responsável pela fixação do carbono durante a fotossíntese. A proteína catalisa duas reações: a carboxilação da D-ribulose 1,5-bisphosphate, o primeiro evento da fixação do carbono, bem como a fragmentação oxidativa do substrato pentose. Ambas as reações ocorrem simultaneamente competindo com o mesmo sitio ativo. A proteína representa mais de 50% das

proteínas do cloroplasto e acredita-se que seja a proteína mais abundante do planeta (SPREITZER e SALVUCCI, 2002).

Os *spots* 01 e 103 foram identificados como sendo a proteína *Oxygen-evolving complex protein 1*. O *spot* 01 foi encontrado no genótipo sensível e essa proteína não teve sua expressão alterada devido ao estresse submetido. O *spot* 103 encontrado no genótipo tolerante teve sua expressão aumentada quando esse foi submetido ao estresse. A proteína está localizada no lúmen do tilacóide, está envolvida na liberação de oxigênio e atua na proteção de estruturas do fotossistema II relacionados à fotossíntese (BRICKER e FRANKEL, 1998). A fotossíntese geralmente é afetada pelo estresse hídrico causando fotooxidação (JIANG et al., 2007).

Um trabalho realizado por Agrawal et al. (2002) encontraram a *Oxygen-evolving complex protein* com superexpressão quando a planta foi submetida a um estresse severo com ozônio. Estes resultados sugerem que as proteínas relacionadas com a evolução de oxigênio são também diferencialmente reguladas por fatores ambientais.

Também foram identificadas as proteínas *NADH dehydrogenase* (*spots* 11 e 13) encontrados nos genótipos com plena irrigação, *Chloroplast a-b* (*spots* 230 e 278). O *spot* 230 foi identificado no genótipo tolerante submetido ao estresse, já o *spot* 278 foi identificado no genótipo sensível com a expressão diminuída na planta quando a mesma foi submetida ao estresse hídrico. *Pyruvate orthophosphate dikinase* (*spots* 03 e 152) foram encontrados no genótipo tolerante. O *spot* 03 foi identificado na planta com irrigação controlada (controle), o mesmo não foi encontrado quando a planta foi submetida ao estresse hídrico, mas voltando a se expressar (*spot* 152) na recuperação do estresse hídrico.

O *spot* 271 foi identificado como a proteína *Lipocalin* encontrada no genótipo sensível com expressão aumentada na planta submetida ao estresse. Esta família de proteínas desempenha várias funções em uma célula, tais como modulação do crescimento celular, ligação de receptores celulares e como também tem resposta ao estresse ambiental (FRENETT CHARRON et al., 2002). Ela foi identificada em plantas monocotiledôneas, tais como *Saccharum officinarum*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, dentre outras espécies. Em um trabalho realizado com trigo avaliando níveis de expressão, essa família estava presente com níveis de expressão diferenciados, sendo relacionado com baixas temperaturas em plantas

resistentes a esse fator, porém não se observou mudanças de expressão nas respostas ao estresse hídrico e salino (FRENETTE CHARRON et al., 2005).

#### 5.5.1.2. Transporte de elétrons

Para este grupo foram identificados 10 *spots* correspondendo às proteínas *ATP synthase* subunidade beta e alfa, *malate dehydrogenase*, *Plastocyanin* e *NADH dependent malic*.

Três *spots* (245, 248, 256) foram identificados como a proteína *ATP synthase* (*alpha*, *beta* e *delta*, respectivamente). A expressão da proteína identificada nos *spots* 245 e 248 não foram alteradas pelo estresse hídrico no genótipo sensível. Já o *spot* 256 teve sua expressão diminuída quando a planta foi submetida ao estresse hídrico no genótipo sensível. Em análises proteômicas de arroz (YAN et al., 2006) e milho (CHANG et al., 2000) a enzima foi identificada com alteração de expressão na planta quando essa foi submetida a estresse por frio. Sairam et al. (2004) já observaram o aumento da expressão da *ATP synthase* sob estresse salino.

A *ATP sintase* é um complexo enzimático formado por cinco subunidades, e encontrado na membrana interna da mitocôndria e no cloroplasto na membrana do tilacóide. O complexo é responsável por catalisar a formação de *ATP* a partir de *ADP* e fosfato inorgânico durante a fosforilação oxidativa e a fotossíntese (ZHANG et al., 2006). Essa enzima é codificada por uma família com cerca de dez genes e esta enzima tem um papel importante nas funções fisiológicas e ambientais nas células vegetais (ZHANG et al., 2006).

Os *spots* 206, 238 foram identificados como a proteína *Malate dehydrogenase* (*MDH*). Essa enzima foi encontrada no genótipo tolerante. O *spot* 206 foi encontrado no controle e o *spot* 238 com expressão aumentada em 2,5 vezes a mais do que no genótipo controle quando o mesmo foi submetido ao estresse hídrico. *MDH* é uma proteína encontrada nas mitocôndrias, com diferentes isoformas, sendo uma enzima chave no ciclo do ácido cítrico, promovendo a conversão de malato para oxaloacetato. O ciclo do ácido cítrico responde por cerca de dois terços da oxidação total dos compostos de carbono da maioria das células e os seus produtos finais são  $\text{CO}_2$  e elétrons de alta energia, os quais passam, via *NADH* e  $\text{FADH}_2$  para a cadeia respiratória (GIETL, 1992).

Os *spots* 70, 66 e 98 foram identificados no grupo funcional que corresponde a proteína *NADP dependent malic enzyme* (NADP-ME). Essa enzima foi caracterizada por apresentar uma expressão aumentada nos dois genótipos contrastantes quando os mesmos foram submetidos ao estresse hídrico. Esta enzima está geralmente associada á fixação do carbono. A determinação da atividade da enzima *NADP dependent malic enzyme*, através da avaliação do estado redox de um sistema celular, tem sido utilizada como metodologia na avaliação de diferentes tipos de estresse em plantas (BÉRIAULT et al., 2005).

A NADP-ME participa em diferentes vias metabólicas e fornece o piruvato para a mitocôndria no processo de respiração e produção de ATP. No entanto, a NADP-ME foi encontrada envolvida nas reações de defesa da planta em respostas a estresse ambiental (ASHAN et al., 2010). Recentemente essa enzima foi encontrada com sua expressão aumentada sob condições de estresse salino, osmótico e hídrico e que sua super expressão de NADP-ME confere tolerância ao estresse osmótico em *Arabidopsis* (ASHAN et al., 2010). Além disso, desta enzima também foi observado em plantas estressadas por boro (PATTERSON et al., 2007).

A proteína *Plastocianina* (*spot* 259) foi identificada com expressão aumentada quando a planta sensível foi submetida ao estresse hídrico. A plastocianina é uma proteína encontrada em plantas superiores, algas e em algumas cianobactérias, localizada no lúmen do tilacóide e ela é uma mediadora da atividade fotossintética no transporte de elétrons entre as membranas do complexo do citocromo e do complexo do fotossistema PSI (KIRCHHOFF et al., 2004).

### 5.5.1.3. Metabolismo da glicose

Foram identificados 4 *spots* para este grupo funcional correspondendo às proteínas *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* e *Fructokinase*.

Os *spots* 267, 79 e 91 foram identificados como a proteína *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*. Essa proteína teve sua expressão aumentada quando as plantas foram submetidas ao estresse hídrico nos dois genótipos contrastantes. A *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* se constitui em uma proteína do metabolismo energético envolvida na glicólise, processo de quebra da glicose relacionado ao metabolismo de carboidratos. Durante esse processo, gliceraldeído-

3-fosfato é convertido em piruvato culminando na formação de acetil-CoA, molécula central no metabolismo geral (ARIAS e MARTINEZ-DE-DRETS, 1976).

As angiospermas e algas possuem duas distintas enzimas (GAPDH), uma encontrada no citosol envolvida na glicólise e outra localizada no cloroplasto a qual participa do ciclo de Calvin (MEYER et al., 1994). A translocação e acúmulo da enzima no núcleo da célula atuam como mecanismo de sinalização para o apoptose ou morte celular programada, através da ativação de fatores de transcrição envolvidos no processo (BERRY e BOULTON, 2000). Essa proteína já foi identificada em estudos proteômicos em maçã, morango (ZHENG et al., 2007) e tomate (FAUROBERT et al., 2007).

Giege et al. (2003) investigou o envolvimento desta enzima em vários processos celulares, como na morte programada de células, reparo e replicação do DNA. Além disso, a expressão diferencial de GAPDH também tem sido observada em diversos estudos de proteômica em resposta ao estresse abiótico (ASHAN et al., 2010).

O *spot* 159 foi identificado como *Fructokinase* em plantas recuperadas do genótipo sensível, a proteína é encontrada em plantas e bactérias. A enzima está envolvida no metabolismo do amido e da glicólise, responsável por catalisar a fosforilação da fructose formando a fructose-6-phosphate (PLOMION et al., 2000).

## **5.5.2. Metabolismo**

### **5.5.2.1. Metabolismo dos carboidratos**

Após a fotossíntese, as proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos são as mais abundantes em tecidos vegetais. Essas proteínas são provavelmente as mais afetadas quando a planta é submetida ao estresse hídrico, no entanto, essa mudança nem sempre é uniforme (PLOMION et al., 2006). Isso pode ser visto como uma estratégia da planta para fornecer energia necessária na ativação de resposta à defesa contra estresse, especialmente se a fotossíntese é inibida. Estes fatores aparentemente podem estar relacionados com os diferentes graus e duração da falta de água, bem como o nível de tolerância das espécies vegetais (SCREVARRÍA- ZOMEÑO et al., 2008).

Foram identificados 13 *spots* para esse grupo funcional, correspondendo às proteínas: *Triosephosphate isomerase*, *phosphoglycerate kinase*, *Ribulose 5-phosphate 3-epimerase*, *Fructose bisphosphate aldolase*, *Ubiquitin-conjugating*, *Phosphoenolpyruvate carboxylase* e *6-phosphogluconolactonase*.

A *Triose fosfato isomerase* é uma enzima envolvida na via glicolítica, responsável por catalisar reversível do gliceraldeído-3-fosfato em diidroacetona fosfato através de duas transferências protônicas envolvendo ácidos carbônicos e transferência adicional de prótons em átomos de oxigênio (ROZOVSKY e McDERMOTT, 2007).

A proteína *Triose fosfato isomerase* foi identificada no genótipo sensível (*spots* 22 e 92). O *spot* (22) foi identificado nas plantas controle e o *spot* (92) teve sua expressão aumentada nas plantas submetidas ao estresse hídrico. Em estudos realizados com plantas submetidas ao estresse hídrico também foi observado o aumento da expressão desta proteína. Uma explicação pode resultar da hipótese de que enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos podem acumular-se no início do estresse, especialmente em espécies tolerantes, a sua expressão poderá diminuir quando a submissão ao estresse for aplicada por mais tempo ou a espécie for menos tolerante a falta de água (SALEKDEH et al., 2002; JORGE et al., 2006; PLOMION et al., 2006; INGLE et al., 2007; BOGEAT-TRIBOULOT et al., 2007). Mas esta hipótese é difícil de avaliar, pois vários fatores poderão estar associados aos ensaios de estresse hídrico, tais como diferentes substratos, grau de severidade do estresse, a idade e espécie da planta e as condições ambientais (SCREVARRÍA-ZOMEÑO et al., 2008).

O *spot* 142 foi identificado como sendo a proteína *Phosphoglycerate kinase*, encontrada no genótipo tolerante após a recuperação. Essa enzima catalisa a formação de ATP para ADP em ambas as direções. Ela é encontrada em todos os organismos atuando na segunda fase da glicólise e na fixação de CO<sub>2</sub> durante a fotossíntese (KUMAR et al., 1999). A *Phosphoglycerate kinase* (PGK) é uma enzima essencial à maioria das células vivas, para a geração de ATP através da rota glicolítica em organismos aeróbios e para a fermentação em anaeróbios (PARSONS et al., 2001). A PGK já foi isolada de uma grande variedade de espécies e são caracterizadas por serem monoméricas, com massas moleculares em torno de 45 kDa, mostrando alto grau de conservação estrutural e sequencial (AUERBACH et al., 1997)

Os *spots* 247 e 277 estão relacionados com as proteínas encontradas no genótipo sensível (controle e estressado, respectivamente) e os *spots* 71 e 141 nas plantas tolerantes (estressada e recuperada, respectivamente). Foram identificadas como sendo a enzima *Frutose bifosfato aldolase*. Essa enzima está envolvida no metabolismo de carboidratos. Como se sabe, a glicose é o principal combustível da maioria dos organismos e ocupa uma posição central no metabolismo. Quando as demandas energéticas aumentam subitamente, a glicose é empregada para produzir energia na forma de ATP. Uma das principais vias de utilização da glicose nas células vegetais superiores é a oxidação da glicose num processo chamado glicólise. Na glicólise uma molécula de glicose é degradada em uma série de 10 reações catalisadas por enzimas para liberar duas moléculas do composto piruvato, contendo cada uma delas três átomos de carbono. Durante as reações da glicólise, parte da energia liberada é conservada na forma de ATP e NADH (LEHINGER et al., 2002). A enzima *frutose bifosfato aldolase* participa ainda da via das pentoses fosfato, uma via alternativa de oxidação de glicose que leva à produção de ribose 5-fosfato, a pentose constituinte dos nucleotídeos que compõem os ácidos nucleicos (MARZZOCO e TORRES, 2007).

A proteína *Ubiquitina-conjugada (spot 32)* foi encontrada no genótipo sensível (controle). Esta é uma enzima que possui muitas subunidades do proteossomo que são proteínas responsáveis pela sinalização e degradação de cadeias polipeptídicas. As vias de proteólise dependentes de ubiquitinação exercem papel crucial durante o desenvolvimento dos organismos. Especialmente em plantas, já foi demonstrado que a ação de fitoreguladores é dependente dessas vias de proteólise (HELLMANN e ESTELLE, 2002).

A Ubiquitina é um polipeptídeo com 76 aminoácidos e tem sido encontrado em todos os eucariotos. Sua seqüência de aminoácidos é uma das mais bem conservadas na natureza. O seu papel é o de "etiquetar" proteínas que estão destinadas a ser rapidamente proteolizadas no citosol (LAM, 1997). Assim, sua expressão é usualmente presente nas plantas submetidas ao estresse hídrico (BRAY, 1993; ZHU et al., 1997).

### 5.5.2.2. Biossíntese de aminoácidos

O *spot* 37 foi identificado no genótipo sensível (controle) como a proteína *Elongation factor 2*, um fator de alongação cuja atividade é potencialmente regulada por fosforilação. Diversas isoformas de EF-2 já foram identificadas em plantas e animais (CELIS et al., 1990; SMAILOV et al., 1993), possivelmente devido à ocorrência da modificação pós-traducional.

### 5.5.2.3. Biossíntese de nucleotídeos

Os *spots* 246 e 273 encontrados no genótipo sensível. O *spot* 246 foi encontrado no controle e o *spot* 273 com aumento de expressão na planta quando submetida ao estresse hídrico. Essa proteína foi identificada como a proteína *Peptidylprolyl cis-trans isomerase*. Esta proteína é encontrada em diferentes compartimentos celulares envolvidas no enovelamento de proteínas (LEVERSON e NESS, 1998). Além disso, ela pode se ligar e doar elétrons a outras proteínas peroxirredoxinas (**Prx**) (LEE et al., 2001).

### 5.5.3. Processos celulares

Foram identificados 12 *spots* relacionados a processos celulares. Entre as proteínas foram encontradas *Chaperona*, *Heat shock*, *Ascorbato peroxidase*, *Superoxide dismutase*, *14,3-3-like* e *Isoflavone reductase*. Este grupo funcional reúne as proteínas relacionadas à divisão e regulação celular e aos mecanismos de defesa contra estresses e já foram identificadas em plantas quando foram submetidas ao estresse hídrico (XIAO et al., 2009). Entre os *spots* identificados (24%) das proteínas relacionadas com processos celulares estavam presentes no genótipo tolerante, enquanto no genótipo sensível foi observado apenas 3% das proteínas identificadas. Estas proteínas identificadas por espectrometria de massas classificadas neste grupo funcional foram significativamente mais expressas quando a plantas do genótipo tolerante foram submetidas ao estresse hídrico e apenas um

*spot* (260) identificado no genótipo sensível teve sua expressão reprimida quando a planta foi submetida ao estresse.

As limitações que o estresse hídrico pode causar na produtividade em plantas sejam sempre objeto de vários estudos. É bem sabido que modificações morfológicas e fisiológicas são as primeiras respostas que as plantas usam para se protegerem contra a dessecação. Sob condições de estresse hídrico, a síntese de proteínas de choque térmico (HSP), peroxidases, e as proteínas envolvidas no transporte de água e o processo de proteólise já foram observadas em plantas submetidas a estresses ambientais. As alterações bioquímicas resultantes de déficit hídrico envolvem uma complexa rede de sinalização celular que requerem fatores de transcrição, proteínas quinases e fosfatases, que desencadeiam a expressão ou regulação dos genes-alvo (RODRIGUES et al., 2009).

Neste grupo funcional foram identificados 4 *spots* (72, 76, 83 e 154) como pertencentes a classe das chaperonas encontradas nos dois genótipos submetidos ao estresse hídrico e dois *spots* 105 e 145 foram identificados como a proteína *Heat shock*, encontradas no genótipo tolerante. Estas proteínas tiveram sua expressão aumentada nos dois genótipos quando os mesmos foram submetidos ao estresse hídrico. Os *spots* 154 e 145 foram reprimidos nas plantas estressadas e voltaram a ter seu volume proteico maior no momento em que essas plantas voltaram à recuperação hídrica.

Proteínas de choque térmico (HSP) é um grupo de proteínas normalmente encontrado em plantas submetidas a déficit hídrico e como o próprio nome sugere, HSP foram primeiramente identificadas como respostas ao estresse ao calor. A capacidade de resposta ao choque térmico amenizada pela síntese de HSP dentro de poucas horas do início do choque é uma resposta geral do organismo e tem sido observada em micróbios e animais, bem como em plantas (WANG, 2003).

Essas respostas múltiplas envolvem uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares. A alteração de tolerância ao estresse adquirida na planta é muitas vezes resultado de vários mecanismos de resposta ao estresse, que agem coordenadamente ou em sinergia para prevenir o dano celular e restabelecer a homeostase celular (WANG, 2003). As HSPs pertencem a várias famílias classificadas de acordo com seu peso molecular mensurado em kilodalton (kDa). Essas famílias são: pequenas Hsp's de 27 kDa, Hsp60 kDa, Hsp70 kDa, Hsp90 kDa entre outras (NEUER et al., 2000). Devido à alta homologia entre as seqüências das

Hsp's de vários grupos de organismos, as mesmas são consideradas proteínas altamente conservadas filogeneticamente (POCKLEY et al., 1999).

Elas recebem esse nome, pois são proteínas cuja expressão é induzida por altas temperaturas, ou seja, sob estresse térmico. Porém, umas variedades de estímulos estressantes elevam a produção das Hsp's como, por exemplo, estímulos do meio ambiente (variação brusca de temperatura, radiação ultravioleta, metais pesados), patológicos (vírus, bactérias, infecções parasitárias, febre, inflamação, auto-imunidade) ou estímulos fisiológicos (fatores de crescimento, diferenciação celular, estímulo hormonal ou desenvolvimento tecidual) (ASEA et al., 2000).

As HPS apresentaram massa molecular aproximada de 70 kDa. Estas proteínas funcionam como chaperonas moleculares, ligando-se a sítios de reconhecimento de proteínas parcialmente dobradas ou desnaturadas, a fim de prevenir a agregação irreversível e o dobramento incorreto da proteína (LANDRY e GIERASCH, 1994). Também podem manter a proteína em uma conformação não-dobrada, para facilitar a translocação da molécula por membranas e proteção contra desnaturação.

As Hsp's possuem várias funções: fazem o transporte de peptídeos, previnem a agregação protéica, auxiliam na preservação da estrutura/função de proteínas celulares em condições de estresse e, como chaperonas moleculares, auxiliam no enovelamento de outras proteínas sem alterar sua função final (VAN ÉDEN, 2000; NEUER et al., 1998). Atuam também na síntese protéica e no transporte entre compartimentos intracelulares (VAN ÉDEN et al., 1998). O termo "chaperona molecular" foi primeiramente descrito devido à função especializada de uma proteína nuclear denominada nucleoplasmina, que promove a união da cromatina (HARTL, 1996).

As HSPs foram descoberta nos anos 70 em glândulas salivares de *Drosophilla melanogaster* submetidas a um estresse por alta temperatura. Hoje, sabe-se que estas proteínas são ativadas em diversos tipos de estresse, e compartilham a resposta ao estresse celular (CSR) com muitas outras proteínas, formando assim, um conjunto básico de proteínas de estresse altamente conservado e presente em todos os organismos (KÜLTZ, 2005). A CRS é uma reação de defesa característica de todas as células procarióticas e eucarióticas e o seu proteoma mínimo inclui proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, reparo e proteção de

proteínas, estabilização e reparo do DNA e cromatina, remoção de proteínas danificadas e em alguns aspectos do metabolismo de energia (KÜLTZ, 2003)

Após o estresse térmico, tanto as células procariotas como os eucariotas produzem um grupo de proteínas com uma massa molecular de 15 a 42 kDa, denominada proteínas pequenas de choque térmico (sHSPs) que em plantas são caracterizadas por se apresentar em abundância e se adaptarem rapidamente as mudanças nas condições ambientais (como temperatura, umidade e luz) (SUN et al., 2002). Sob condições normais de crescimento, a maioria sHSPs não pode ser detectadas nos tecidos vegetativos, mas são rapidamente produzidos em resposta ao calor. Vários genes de sHSP são induzidos pelo estresse causado pelo frio, por metal, ozônio e radiação UV, estas observações sugerem que as HSPs estão associadas diretamente a estresses abióticos (SUN et al., 2002).

Sato e Yokoya (2008) mostraram que a superexpressão de uma HSP aumenta a tolerância ao déficit hídrico em folhas de *Oryza sativa* submetida a estresse osmótico por polietileno glicol. Sung et al. (2001) observaram que a superexpressão de uma HSP70 citossólica em folhas resultou no aumento de tolerância a estresse abiótico. A maioria dos trabalhos apresenta HSPs como um grupo de proteínas que são induzidas em condições de estresse e com função de proteção e reparo de danos causados por diversos tipos de estresse (LIU et al., 2007; SU e LI, 2008).

As HSPs são também denominadas de chaperonas e exercem papel fundamental na conformação tridimensional de proteínas e conseqüentemente na variedade de atividades e especificidade. Estas proteínas estão também envolvidas em mecanismos ligados ao estresse. As chaperonas são proteínas que desempenham papel fundamental no processamento protéico. Atualmente, elas são divididas em duas classes de acordo com sua localização celular: a) as chaperoninas do tipo I que estão presentes no estroma do cloroplasto, matriz das mitocôndrias e em eubactérias; e b) as chaperoninas do tipo II que estão no citossol de eucariotos e em arqueobactérias (KOUMOTO et al., 2001). Uma das principais diferenças entre as duas classes é que as chaperoninas do grupo I têm sua atividade dependente de co-chaperoninas (KOUMOTO et al., 2001).

As chaperonas moleculares são componentes fundamentais que contribuem para a homeostase celular nas células em condições adversas de crescimento. Elas são responsáveis por uma ampla variedade de processos normais como dobradura,

montagem, translocação e degradação das proteínas, como também têm a função de estabilizar proteínas e ajudando na renaturação de proteínas sob condições de estresse (WANG, 2004).

As chaperonas encontram-se localizadas em diversos compartimentos subcelulares com citossol, retículo endoplasmático, plastídeos e mitocôndrias (SUNG e GUY, 2003). As chaperonas HSP 70 desempenham diversas funções celulares, tais como estabilização das cadeias de proteínas nascentes, manutenção de translocação e conformação protéica para importação de proteínas em compartimentos subcelulares, envolvida em etapas de processamento protéico, transporte através da membrana, modulação da atividade de algumas proteínas, montagem e desmontagem de complexos protéicos e ainda prevenção de agregação irreversível de algumas proteínas (SU e LI, 2008).

As chaperonas são expressas em resposta a ativação da via de sinalização *Unfolded Protein Response* (UPR) ativada pela acumulação de proteínas mal-dobradas no retículo endoplasmático (HORVÁTH et al., 2008). Esta via ativa a transcrição coordenada de um conjunto de genes envolvidos no restabelecimento da homeostase no retículo endoplasmático. Liu et al. (2002) e Costa (2007) mostraram que alguns fatores transcricionais ativados pela via UPR regulam a transcrição e atividade de inúmeras chaperonas moleculares, genes relacionados ao *endoplasmatic reticulum associated degradation* (ERAD), e de proteínas secretórias. Lin et al. (2007) mostraram que em mamíferos a expressão de fatores transcricionais ativados pela UPR é alta em estágios iniciais de doenças com função de proteção celular, mas que em fases ainda mais tardias a expressão de fatores transcricionais ativados pela UPR é drasticamente reduzida e a célula começa a exibir mecanismos relacionados com a expressão de proteínas relacionadas a morte celular programada.

Sabe-se que a morte celular programada é um processo celular que está envolvido na defesa e é seguido de uma diminuição de proteínas relacionadas a proteção celular e ainda o aumento de outras proteínas (REAPE e McGABE, 2008). Trabalhos realizados com *Coffea canephora* demonstraram uma redução significativa na abundância relativa destas chaperonas em raízes quando submetidas a condições de estresse hídrico (SOARES, 2008).

Estresses abióticos como a seca, salinidade, extremos de temperatura, toxicidade química e estresse oxidativo são ameaças graves para a agricultura e como resultado a deterioração do meio ambiente. O estresse abiótico é a principal causa mundial de perda de safra, reduzindo a rendimento médio para a maioria das principais plantas cultivadas em mais de 50% (WANG, 2004).

O *spot* 221 foi identificado como a proteína *14,3-3-like*. Essa proteína foi encontrada nas plantas controle do genótipo tolerante. A *14,3-3-like* é uma proteína citosólica que desempenha mais de uma função na célula, envolvidas no controle da transcrição, regulação da síntese de ATP e tem grande importância na transmissão de sinais, atuando sobre proteínas já fosforiladas e têm função complementar, além da modificação das proteínas alvo nas plantas (FERL, 2004). A família das proteínas 14-3-3 é encontrada em todos os eucariotos, é altamente conservada entre as espécies ocorrendo em distintas isoformas (FERL, 1996). Em *Arabidopsis* foram encontradas trinta diferentes isoformas das proteínas 14-3-3, com genes distribuídos em cinco cromossomos (DELILLE et al, 2001). Algumas isoformas são induzidas por patógenos (BRANDT et al., 1992) ou baixas temperaturas (JARILLO et al., 1994). Altas concentrações de sais reduzem a expressão dos genes relacionados às proteínas 14-3-3 (CHEN et al., 1994). Resultados obtidos por Lapointe (2002) sugerem o envolvimento da família das proteínas 14-3-3 na transdução de sinais relacionados ao estresse, podendo interagir com enzimas envolvidas em mecanismos relacionados a respostas de defesa, incluindo *Ascorbate peroxidase* (ZHANG et al., 1997).

A proteína *isoflavone reductase* (IEF) (*spots* 38 e 151) está envolvida em respostas a estresse biótico e abiótico (HIBI et al., 1994; BABIYCHUK et al., 1995; PETRUCCO et al., 1996; LERS et al., 1998). Foram encontradas nas plantas tolerantes submetidas ao estresse. A atividade das IFR em mecanismos de defesa confere durabilidade, longevidade e resistência do alburno de plantas contra o ataque microbiano e também previne o apodrecimento da madeira por fungos (DIXON, 1999). Nos últimos anos um grande número de genes com significativa homologia a *isoflavone reductase* foram encontrados (GANG et al., 1999) em diferentes plantas lenhosas e não lenhosas como *Arabidopsis thaliana* (BABIYCHUCK et al., 1995), álamo (GANG et al., 1998), pereira (KATAYAMA et al., 1993), tabaco (SHOJI et al., 2002) entre outras espécies.

Foram identificados três *spots* neste grupo funcional correspondendo a proteína *Superoxide dismutase*. Os *spots* 95 e 239 foram identificados nas plantas tolerantes submetidas ao estresse, já o *spot* 260 foi identificado com expressão diminuída na plantas sensível quando submetida ao estresse hídrico. O *spot* 211 encontrado nas plantas controle do genótipo tolerante foi identificado como sendo a *Ascorbato peroxidase* (APX). Estas proteínas são relacionadas com função de defesa contra estresses.

A *Ascorbato peroxidase* (APX) é a enzima mais importante do sistema oxidativo, atuando no controle e modulação dos níveis intracelulares do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), desempenhando um papel fundamental na remoção de peróxido de hidrogênio como doador de elétrons no citosol e cloroplastos de plantas superiores (ISHIKAWA e SHIGEOKA, 2008). As peroxidases participam de vários processos metabólicos essenciais incluindo regulação do crescimento celular (GOLDBERGET et al., 1985), lignificação, oxidação de fenóis, proteção contra estresses bióticos e abióticos, incluindo defesa contra ataques de patógenos (GRISEBACH, 1981).

A proteína *Superoxide dismutase* é considerada uma importante enzima no sistema de defesa antioxidante e está relacionada a processos como transporte de íons inorgânicos e proteção celular através da sua capacidade de catalisar a conversão de  $O_2^-$  para  $H_2O_2$ . A enzima é encontrada em todos os organismos que consomem oxigênio, em plantas pode ser encontrada na mitocôndria, citosol e cloroplasto (SCANDALIOS, 1997).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) é muitas vezes a primeira resposta detectável ao estresse biótico e ambiental em plantas, ROS tem o potencial de causar sérios danos biológicos, portanto, as células vegetais conseguem regular o nível de EROs por meio de mecanismos sofisticados utilizando proteínas de defesa para minimizar os danos causados pelas ROS.

As EROs são geradas exogenamente por agentes ambientais ou endogenamente como uma consequência dos processos metabólicos, incluindo a respiração celular. A formação de EROs por organismos aeróbicos é conduzida de modo a obter concentrações fisiológicas dessas espécies, as quais são requeridas para a função celular normal, ou quantidades excessivas que levam ao aumento do estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre quando a produção de EROs excede a capacidade antioxidante celular, causando danos em muitos constituintes

celulares, como lipídios insaturados, proteínas e DNA. As EROs incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas e derivadas do oxigênio, como por exemplo o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil (OH) (ZHANG et al., 2009).

Trabalhos realizados com Nicotina demonstraram que o aumento ou diminuição destas enzimas causam estresses e geram EROs podendo induzir uma maior tolerância a EROs ou morte celular (ZHANG et al., 2009).

#### 5.5.4. Estrutura

O *spot* 100 foi identificado como uma proteína importante na organização do citoesqueleto e relacionada ao metabolismo da parede celular, a *Beta actin*. O citoesqueleto é formado por microtúbulos e filamentos de actina, gerados a partir das proteínas tubulinas e actinas, respectivamente (DROABAK et al., 2004). A *beta actin* foi identificada nas folhas do genótipo sensível quando esse foi submetido ao estresse hídrico. A deposição padronizada de microfibrilas de celulose na parede celular secundária é um dos principais eventos do desenvolvimento das células do xilema, sendo preciso e dinamicamente regulado pelo citoesqueleto (ODA e HASEZAWA, 2006). A actina é uma proteína envolvida com a formação dos filamentos que compõem o citoesqueleto. Em plantas existem várias isoformas de actina que estão envolvidas em diferentes funções como o fluxo citoplasmático, divisão celular, determinação da forma celular, gravitropismo e deposição de parede celular (HERMAN, 1993). Wan et al., (2005) mostraram que existe uma indução da expressão de actina depois de eventos de estresse abiótico como também em casos de infecção radicular, ocorrendo um rearranjo do citoesqueleto das células.

A proteína *Actin* está envolvida na manutenção da polaridade celular, por meio do fornecimento de sinais para o movimento de organelas celulares agrupadas, como também na resposta a estímulos ambientais (STRAIGER, 2000) e gravitacionais (YAMANOTO e KISS, 2002), e na transdução de estímulos físicos, como por exemplo, o toque e a exposição à alta temperatura (STRAIGER, 2000; SCHMELZER, 2002).

### 5.5.5. Homeostase: Redox

Foram identificados três spots relacionados com proteínas que fazem parte do grupo funcional redox. A proteína *Tioredoxina* (spots 25 e 240) foi encontrada nas plantas dos dois genótipos submetidos ao estresse hídrico e o spot 228 encontrado no genótipo tolerante sob condições de estresse hídrico foi identificado como a proteína *Ferredoxina NADP redutase*.

Estas proteínas são membros do sistema redox encontradas em diferentes compartimentos celulares. A tioredoxina é uma pequena proteína com atividade de reduzir dissulfeto, agem como substrato para as enzimas redutoras, tais como enzimas peroxidases e ribonucleotídeo redutase, como um componente essencial na estrutura do DNA polimerase, na prevenção da apoptose e na capacidade de agir como um sensor redox envolvidos na sinalização celular (MONTRICHARD et al., 2009).

O spot 228 também encontrado no genótipo tolerante sob condições de estresse hídrico foi identificado como a proteína *Ferredoxina NADP redutase*. As ferredoxinas nas plantas atuam no armazenamento de ferro e são proteínas capazes de acomodar 4.500 átomos de ferro em uma cavidade central (AROSIO e LEVI, 2002) e são utilizadas para regular a concentração de ferro nos cloroplastos, a fim de evitar a toxicidade de ferro.

Estas proteínas fazem parte de um sistema reconhecido como os principais reguladores do ambiente redox intracelular e atua na defesa antioxidante, bem como no controle da regulação redox de diversos processos celulares e além de atuar na prevenção, intervenção e reparo de danos às proteínas causados pelo estresse oxidativo (MONTRICHARD et al., 2009).

### 5.6. Considerações finais

O nível de expressão das proteínas identificadas neste trabalho pode contribuir para o melhoramento vegetal, pois identifica pontos-chave de atuação dessas proteínas nos mecanismos de resposta de dois genótipos contrastantes ao estresse hídrico.

A espectrometria de massas, utilizada para o sequenciamento de peptídeos trípticos de proteínas previamente resolvidas por eletroforese bidimensional,

constitui uma estratégia eficiente para reconhecer o conjunto de proteínas expressas em um tecido, sob uma determinada condição ou estágio de desenvolvimento. No presente trabalho, muitas etapas envolvidas na execução de ambas as técnicas foram revistas a partir dos protocolos originais, ajustando a metodologia ao material que se objetivou estudar e ao tipo de espectrômetro de massa disponível para a realização das análises. Dessa maneira, o êxito foi alcançado na identificação funcional de *spots*, sendo a maioria deles abundantemente expressos no tecido analisado.

## **6. CONCLUSÕES**

---

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ Entre os métodos de extração de proteínas dos tecidos de folhas de cana-de-açúcar, o método fenólico apresentou os melhores resultados resultando em um maior número de “spots” totais e específicos, maior reprodutibilidade e melhor qualidade nos géis, removendo os componentes não protéicos que interferem na focalização.
- ✓ A combinação de 2D-PAGE e Espectrometria de massas (MALDI-TOF MS/MS) possibilitaram uma precisa separação e identificação de 80 proteínas de tecido de folhas de cana-de-açúcar diferencialmente expressas durante o estresse hídrico para os dois genótipos estudados. Foram identificadas 14 novas proteínas ainda não descritas para cana-de-açúcar, tais como: *Oxygen evolving complex 1*, Triosephosphate isomerase, Ubiquitin – conjugating, Phosphoglycerate mutase, Fructose biphosphate aldolase cytoplasmic, 6-phosphogluconate dehydrogenase, Heat shock, Frutokinase-1, Ascorbate peroxidase, 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase, Ferredoxin NADP reductase, Chlorophyl a-b, Nucleic acid binding protein1, Auxin.
- ✓ Das proteínas identificadas que fazem parte de processos celulares relacionados a estresses, 24% foram encontradas no genótipo tolerante e apenas 3% encontrados no genótipo sensível ao estresse hídrico.

# REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R. GOODLET, D.R. Mass spectrometry in proteomics. **Chemical Reviews**, v. 101, p. 269-295, 2001.

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p. 198-207, 2003.

AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R.; TAMOGAMI, S.; YONEMURA, M.; KUBO, A.; SAJI, H. Chitosan activates defense/stress responses(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, p. 1061-1069, 2002.

AHSAN, N.; LEE, D. G.; KIM, K. H.; ALAM, I.; LEE, S. H.; LEE, K. W.; LEE, H.; LEE B. H. Analysis of arsenic stress-induced differentially expressed proteins in rice leaves by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 78, p. 224–231, 2010.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 574, 1998.

ALMEIDA, A. M.; CARDOSO, L. A.; SANTOS, D. M.; TORNÉ, J. M.; FEVEREIRO, P. S. Trehalose and its applications in plant biotechnology. **In vitro cellular & developmental biology. Plant / Society for In Vitro Biology**, Oxon, v. 43, p.167–177, 2007.

ANDERSON, N. G., MATHESON, A., and ANDERSON, N. L. Back to the future: the human protein index (HPI) and the agenda for post-proteomic biology. **Proteomics**, V. 1, p. 3–12, 2001.

ANDREY, B. **Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction**. New York. John Wiley, p. 276, 2003.

ARIAS, A.; MARTINEZ-DE-DRETS, G. Glycerol metabolism in *Rhizobium*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 66, p. 150-153, 1976.

AROSIO P, LEVI S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, p. 457–463, 2002.

ASEA, A.; KRAEFT, S.; KURT-JONES, E. A.; STEVENSON, M. A.; CHEN, L. B.; FINBERG, R. W.; KOO, G. C.; CALDERWOOD, K.S. HSP 70 stimulates cytokine production through a CD 14-dependent pathway, demonstrating its dual role as chaperone and cytokine. **Natural Medicine**, v. 6, p. 435-442, 2000.

- 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.
- ASKAR, H., J. EDQUIST, M. HAJHEIDARI, M. KAFI G.H.; and SALEKDEH. Affect of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves. **Proteomics**, v. 6, p. 2542–2554, 2006.
- AUERBACH, G.; HUBER, R.; GRÄTTINGER, M.; ZAISS, K.; SCHURIG, H.; JAENICKE, R.; JACOB, U. Closed structure of phosphoglycerate kinase from *Thermotoga maritime* reveals the catalytic mechanism and determinants of thermal stability. **Structure**, Philadelphia, v. 5, n. 11, p. 1475- 1483, 1997.
- BABIYCHUK, E.; KUSHNIR, S.; BELLES-BOIX, E.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. *Arabidopsis thaliana* NADPH oxidoreductase homologs confer tolerance of yeasts toward the thiol-oxidizing drug diamine. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, p. 26224-26231, 1995.
- BAE, M. S.; CHO, E. J.; CHOI, E.; PARK, O. K. Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. **The Plant Journal**, v. 36, n. 5, p. 652-663, 2003.
- BAGINSKI, S.; GRUISSEM, W.; *Arabidopsis thaliana* proteomics: from proteome to genome. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 9, p. 1485-1491, 2006.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 24, n. 1, p.23-58, 2005.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas (noções básicas)**. 1ª ed. Jaboticabal, FUNEP, p. 42, 1988.
- BERGONCI, J. I. et al. Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1531-1540, 2000.
- BÉRIAULT, R.; CHÉNIER, D.; SINGH, BERKELMAN, T.; STENSTED, T. 2-D Electrophoresis: **Principles and Methods**. Edition AC (80-6429-60). GE Healthcare, Manual do fabricante, 2004.
- BERRY, M. D.; BOULTON, A. A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and apoptosis. **Journal of neuroscience research**, New York, v. 60, p. 150-154, 2000.
- BOGEAT-TRIBOULOT M. B.; BROSCHE M.; RENAUT J.; JOUVE L.; L. E.; THIEC D.; FAYYAZ P.; VINOUCUR B.; WITTERS E.; LAUKENS K.; TEICHMANN T.; ALTMAN A.; HAUSMAN J. F.; POLLE A.; KANGASJARVI J.; DREYER E. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. **Plant Physiology**, v. 143, p. 876–892, 2007.
- BRACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: **Quantitative and physical mapping of cellular proteins**. Reviews: TIBTECH., v. 17, P. 121-127, 1999.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 248-254, 1976.
- BRAY, E. A. Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarrays and differential expression data. **Annals of Botany**, v. 89, p. 803-811, 2002.
- BRAY, E. A. Molecular to water deficit. **Plant Physiology**, v. 103, p. 1035-1040, 1993.
- BRAY; E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. IN: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds). **Biochemistry and molecular biology of plants**. 3rd. ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1158-1203, 2001.
- BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P.M.; LOCY, R. D. **Fisiologia do estresse**. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. Porto Alegre: Artmed, Trad. Eliane Romanato Santarém et al., p. 613-643, 2004.
- BRICKER, T. M.; FRANKEL, L. M. The structure and function of the 33 kDa extrinsic protein of photosystem II: A critical assessment. **Photosynthesis research**, Boston, v. 56, p. 157-173, 1998.
- BUSTILLOS, O. V.; SASSINE, A.; MARCH, R. **Espectrometria de massas quadrupolar**. São Paulo: Scortecci Editora, p. 162, 2003.
- CAGNEY, G. AMIRI, S.; PREMAWARADENA, T.; LINDO, M.; EMILI, A. In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. **Proteome Science**, v.1, p. 1-15, 2003.
- CAHILL, D. J.; NORDHOFF, E.; O'BRIEN, J.; KLOSE, J.; EICKHOFF, H.; LEHRACH, H. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J. (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. Bios Scientific Publishers Limited, p. 1-22, 2001.
- CAMARGO, P. N. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Piracicaba: ESALQ, p. 38, 1968.
- CAMBRAIA, J. **Aspectos bioquímicos, celulares e fisiológicos dos estresses nutricionais em plantas**. In: Eds. NOGUEIRA, R. J. M.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. T. Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas, p. 95-105, 2005.
- CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 25, p. 1327-1333, 2004.
- CARPENTIER SC, WITTERS E, LAUKENS K, DECKERS P, SWENNEN R, PANIS B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of

- different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, p.2497–2507, 2005.
- CASAGRANDE, E. C.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; OYA, T.; PEDROSO, J.; MARTINS, P. K.; BRETON, M. C.; NEPOMUCENO, A. L. Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n. 2, p. 168-184, 2001.
- CASAGRANDE, A. A. **Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, p. 157, 1991.
- CASH, F. Review: Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. **Analytical Chemistry Acta**, v. 372, p. 121-145, 1998.
- CASTRO, A. J.; CARAPITO, C.; ZORN, N.; MAGNÉ, C.; LEIZE, E.; VAN DORSSELAER, A.; CLEMENT, C. Proteomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 2783-2795, 2005.
- CELIS, J. E.; MADSEN, P.; RYAZANOV, A. G. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, p. 4231-4235, 1990.
- CHAMRAD, D. C.; KORTING, G.; STUHLER, K. K.; MEYER, H. E.; KLOSE, J.; BLUGGEL, M. Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. **Proteomics**, v. 4, n. 3, p. 619-628, 2004.
- CHAMRAD, D.C.; KOERTING, G.; GOBOM, J.; THIELE, H.; KLIOSE, J.; MEYER, H. E. BLUEGGEL, M. Interpretation of mass spectrometry data for high-throughput proteomics. **Bionality Chemistry**, v. 376, n. 7, p. 1014-1022, 2003.
- CHANG, W. W. P.; HUANG, L.; SHEN, M.; WEBSTER, C.; BURLINGAME, A. L.; ROBERTS, J. K. M. Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. **Plant Physiology**, v.122, p.295–318, 2000.
- CHAVES M. M.; MAROCO J. P.; PEREIRA J. S. Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. **Function Plant Biology**, v. 30, p. 239–264, 2003.
- CHEN, DONG, YU, L. X., GREER, A. F., CHERITI, H. and TABAEIZADEH, Z., Isolation of an osmotic stress and abscisic acid-induced gene encoding an acidic endochitinase from *Lycopersicon chilense*. **Molecular Genetics**, v. 245, p. 195–202, 1994.
- CHEN, S.; HARMON, A.C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, p. 5504-5516, 2006.

- CHEN, T. H. H.; MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Current Opinion in Plant Biology**. V. 5, p. 250-257, 2002.
- CORNIC G. & MASSACCI A. **Leaf photosynthesis under drought stress**. In Photosynthesis and the Environment. Ed. N. R. Baker, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 347–366, 1996.
- COSTA, P.; PIONNEAU, C.; BAUM, G.; BAHRMANN, N.; KREMER, A.; FRIGERIO, J. M.; PLOMION, C. Separation and characterization of needle and xylem maritime pine proteins. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 20, p. 1098, 1108, 1999.
- COSTA, M. D. L. **Estresse osmótico e do retículo endoplasmático induzem morte celular programada de maneira dependente das proteínas NRPs**. Viçosa: UFV, p. 123, Tese de Mestrado, 2007.
- CROZIER, A.; JENSEN, E.; LEAN, M.E.J.; MCDONALD, M.S. & BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 590-595, 1997.
- CUSHMAN, J. C.; BOHNERT, H. J. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p.117–124, 2000.
- DA MATTA, F. M.; MAESTRI, M.; BARROS, R. S. Photosynthetic performance of two coffee species under drought. **Photosynthetica**, v. 34, p. 257-264, 1997.
- DAMERVAL C, DE VIENNE D, ZIVY M, THIELLEMENT H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, p. 52–4, 1986.
- DANI, V. et al. Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. **Proteomics**, v. 5, p. 737-745, 2005.
- DAVIES, W.J.; ZHANG, J. Root signals and the regulation of growth and development of plants in rying soil. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, p.55-76, 1991.
- DAVIS, W. J.; MANSFIELD, T. A.; HETHERINGTON, A. M. Sensing of soil water status and the regulation of plant growth and development. **Plant Cell Environmental**, v. 13, p. 709-719, 1990.
- DELILLE, J. M.; SEHNKE, P. C.; FERL, R. J. The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 126, p. 35-38, 2001.
- DERGISI, G. The effects of drought on plants and tolerance mechanism (Review). **Journal of science**, v. 18, n. 4, p. 723-740, 2005.
- DESIERE, F. et al. Integration with the human genome of peptide sequences obtained by high-throughput mass spectrometry. **Genome Biology**, v. 6, n. 1, 2004.

- DIAS, L. C.; FLOH, E. I. S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. **Proteômica comparativa aplicada à cultura de tecidos de plantas**. 2000.
- DIXON, R. A. **Polyketides and Other Secondary Metabolites Including Fatty Acids and Their Derivatives**. Amsterdam, Elsevier, p. 823, 1999.
- DOOKI, A. D.; MAYER-POSNER F. J., ASKARI H.; ZAIEE, A. and. SALEKDEH. G. H. Proteomic responses of rice young panicles to salinity. **Proteomics**, v. 6, p. 6498–6507, 2006.
- DROBAK B. K.; FRANKLIN-TONG, V. E. STAIGER, C. J. The role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling. **New Phytologist**. Oxon, v. 163, p. 13-30, 2004.
- DUNN, M. J. **Proteins**. Oxford: Clarendon Press, p. 407, 1993.
- DUNN, M. J.; GÖRG, A. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis for proteome analysis. In: PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J. (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. Bios Scientific Publishers Limited, p. 43-63, 2001.
- DUPONT FM, CK TANAKA, WJ HURKMAN. Separation and immunological characterization of membrane fractions from barley roots. **Plant Physiology**, v. 86, n. 7, p. 17-724, 1988.
- ECHEVARRÍA-ZOMEÑO, S.; ARIZA, D.; JORGE, I.; LENZ, C.; CAMPO, A. D.; JORRÍN, J. V.; NAVARRO R. M. Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery. **Journal Plant Physiology**, p. 1-13, 2009.
- ELIAS, J. E.; HAAS, W.; FAHERTY, B. K.; GYGI, S. P. Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. **Nature methods**, v. 2, n. 9, p. 667-675, 2005.
- ENG, J. K.; MCCORMACK, A. L.; YATES, J. R. An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database. **Journal of the American Society for mass Spectrometry**, v. 5, n. 11, p. 976-989, 1994.
- FANCELLI, A. L. **Ambiente e produtividade**. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. (Ed). Milho: Estratégias de manejo para alta produtividade. Piracicaba: LPV; ESALQ. Departamento de Produção Vegetal, p. 174-197, 2003.
- FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. **Produção de milho**. – Guaíba, p. 360, 2000.
- FAO (Food and Agriculture Organization). Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/topic1.htm#brazil>>. Acesso em: 25 jan. 2010.

- FAUROBERT, M. et al. Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. **Plant Physiology**, v. 143, p. 1327-1346, março, 2007.
- FERL, R. J. 14-3-3 proteins and signal transduction. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 49-73, 1996.
- FERL, R. J.; MANAK, M. S.; REYES, M. F. Protein family review. The 14-3-3s. **Genome Biology**, London, v. 3, n. 7, p. 1-7, 2002.
- FILHO, J. T. C.; e SERAPHIN, E. S. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil.) em resposta ao estresse hídrico. **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.2, p.199-204, jun. 2001.
- 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, p.269-279, 2004.
- FRENETTE CHARRON, J. B.; BRETON, G.; BADAWI, M.; SARHAN, F. Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and Arabidopsis. **Federation of European Biochemical Societies** v. 517, p. 129–132, 2002.
- FRENETTE CHARRON, J. B.; OUELLET, F.; PELLETIER, M.; DANYLUK, J.; CHAUVE, C.; SARHAN, F. Identification, Expression, and Evolutionary Analyses of Plant Lipocalins. **Plant Physiology**, vol. 139, p. 2017–2028, 2005.
- GALLARDO, K., JOB, C., GROOT, S.P., PUYPE, M., DEMOL, H., VANDEKERCKHOVE, J., JOB, D. Proteomics of Arabidopsis seed germination. A comparative study of wild-type and gibberelli in deficient seeds. **Plant Physiology**. v. 129, p. 823–837, 2002.
- GANG, D. R.; KASAHARA, H.; XIA, Z. Q.; VANDER, M. K.; BAUW, G; BOERJAN, W.; van MONTAGU, M.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Evolution of plant defense mechanisms. Relationships of phenylcoumaram benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases. **Journal Biology Chemistry**, v. 274, p. 7526-27, 1999.
- GARAVELL, J. S.; HOU, Z.; PATTABIRAMAN, N.; STEPHENS, R. M. The resid data of protein structure modifications and the NRL-3D sequence-structure database. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 199-201, 2001.
- GE HEALTHCARE. 2D Electrophoresis. **Principles and Methods**, p. 67, 2004.
- GIAVALISCO, P., ECKHARD, N., KREITLER, T., KLÖPPEL, K-D., et al. High heterogeneity within the ribosomal proteins of the *Arabidopsis thaliana* 80S ribosome **Proteomics**, v. 7, p. 1902–1913, 2005.

- GIAVALISCO, P., NORDHOFF, E., LEHRACH, H., GOBOM, J., KLOSE, J., Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis, **Electrophoresis**, v. 24, p. 207–216, 2004.
- GIEGE, P.; HEAZLEWOOD, J. L.; ROESSNER-TUANLI, U.; MILLAR, A. H.; FERNIE, A. R.; LEAVER, C. J.; SWEETLOVE, L. J. Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells. **Plant Cell**, v. 15, p. 2140–2151, 2003.
- GIETL, C. Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 100, p. 199-201, 2001.
- GION, J. M.; LALANNE, C.; LE PROVOST, G.; FERRY-DUMAZET, H.; PAIVA, J.; CHAUMEIL, P.; FRIGERIO, J. M.; BRACH, J.; BARRE, A.; DE DARUVAR, A.; CLAVEROL, S.; BONNEU, M.; SOMMERER, N.; NEGRORI, L.; PLOMOIN, C. The proteome of maritime pine wood forming tissue. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 3731-3751, 2005.
- GIORGIANNI, S. B. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry in biochemistry. **Biochemistry Journal**. v. 355, p. 545-561, 2003.
- GOLDBERT, R.; LÊ, T.; CATESSON, A. M. Localization and properties of cell wall enzyme activities related to the final stages of lignin biosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 36, p. 503-510, 1985.
- GORG A, WEISSW, DUNN MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p.3665–3685, 2004.
- GÖRG, A., OBERMAIER, C., BOGUTH, G., HARDER, A. *et al.*, **Electrophoresis**, v. 21, p. 1037–1053, 2000.
- GRANIER F. Extraction of plant-proteins for two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 9, p. 712–718, 1988.
- GRIFFIN, T. J.; AEBERSOLD, R. Advances in proteome analysis by mass spectrometry. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 49, p. 4597-500, 2002.
- GRISEBACH, H. Lignins, In: CONN, E. E. (Ed.) **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, v. 7, p. 457-478, 1981.
- GUERREIRO, N.; REDMOND, J. W.; ROLFE, B. G.; DJORDJEVIC, M. A. New Rhizobium leguminosarum flavonoid-induced proteins revealed by proteome analysis of differentially displayed proteins. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 10. n. 4, p. 506-516, 1997.
- GYGI, S. P.; CORTHAIS, G. L.; ZHANG, Y.; AEBERSOLD, R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analyses technology. **Proceeding**

---

of the National Academic of Sciences of the United States of America, Washington, v. 97, p. 9390-9395, 2000.

HARE, P.D.; CRESS, W.A.; VAN STADEN, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant, Cell and Environment**, v.21, p.535-553, 1998.

HARTL, F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v. 381, p. 571–580, 1996.

HELLMANN, H., ESTELLE, M. Degradation Plant Development: Regulation by Protein. **Science**, Washington, v. 297, p. 793-797, 2002.

HERMAN, I. M. Action isoforms. **Current opinion in cell biology**, Philadelphia, v. 5, p. 48-55, 1993.

HERMANN, E.R.; CÂMARA, G. M. S. Um método simples para estimar a área foliar de cana-de-açúcar. **Revista da STAB**. Piracicaba, v.17, n.5, p.32-34, 1999.

HIBI, N.; HIGASHIGUCHI, S.; HASHIMOTO, T.; YAMADA, Y. Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 723-735, 1994.

HIEN, D.T.; JACOBS, M.; ANGENON, G.; HERMANS, C.; THU, T.T.; VAN SON, L.E.; ROOSENS, N.H. Proline accumulation and 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. **Plant Science**, v.165, p.1059-1068, 2003.

HORVÁTH, I.; MULTHOFF, G.; SONNLEITNER, A.; VÍGH, L. Membrane associated stress proteins: more than simply chaperones. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1778, v. 7, p. 1653-1664, 2008.

HOVING, S.; GERRITS, B.; VOSHOL, H.; MULLER, D.; ROBERTS, R. C.; VAN OOSTRUM, J. Preparative two-dimensional gel electrophoresis at alkaline pH using narrow range immobilized pH gradients. **Proteomics**, Weinheim, v. 2, p. 127-134, 2002.

HURKMAN WJ, TANAKA CK. Solubilization of plant membrane-proteins for analysis by two-dimensional gel-electrophoresis, **Plant Physiology**, v. 81, p. 802–806, 1986.

INGLE, R. A.; SCHMIDT, U. G.; FARRANT, J. M.; THOMSON, J. A.; MUNDREE, S. G. Proteomic analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. **Plant Cell Environment**, v. 30, p. 435–46, 2007.

INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v. 92, p. 185-202, 2005.

ISHIKAWA, T.; SHIGEOKA, S. Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, p. 1143-1154, 2008.

- JAMES, P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. **Quarterly Review of Biophysics**, v. 30, n. 4, p. 279-331, 1997.
- JANGPROMMA, N.; KITTHAISONG, S.; LOMTHAISONG, K.; DADUANG, S.; JAISIL, P. and THAMMASIRIRAK, S. A Proteomics Analysis of Drought Stress-Responsive Proteins as Biomarker for Drought-Tolerant Sugarcane Cultivars. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6 n. 2, p. 89-102, 2010.
- JARRILO, J. A.; CAPEL, J.; LEYVA, A.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M.; SALINAS, J. Two related low-temperature-inducible genes of *Arabidopsis* encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 25, p. 693-704, 1994.
- JIANG, Y.; YANG, B.; HARRIS, N. S.; DEYHOLOS, M. K. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. **Journal of Experimental Botany**, Southampton, UK, v. 58, n. 13, p. 3591-3607, Oct. 2007.
- JORGE, I.; NAVARRO, R. M.; LENZ, C.; ARIZA, D., JORRIN, J. Variation in the holm oak leaf proteome at different plant developmental stages, between provenances and in response to drought stress. **Proteomics**, v. 6, p. 207–214, 2006.
- JORRÍN JV, MALDONADO AM, CASTILLEJO MA. Plant proteome analysis: A 2006 update. **Proteomics**, v. 7, p. 2947–2962, 2007.
- JOUBERT, R.; BRIGNON, P.; LEHMANN, C.; MONRIBOT, C.; GENDRE, F.; BOUCHERIE, H. Two-dimensional gel analysis of the proteome of lager brewing yeasts. **Yeasts**, v. 16, p. 511-522, 2000.
- JUNGBLUT, P. R. Proteome analysis of bacterial pathogens. **Microbes Infectology** v. 3, p. 831-840, 2001.
- KALUME, D. E.; IBARROLA, N.; GRONBORG, M.; IWAHORI, A.; PANDEY, A.; A proteomic approach for quantitation of phosphorylation using isotope labeling in cell culture. **Analytical chemistry**, Washington, v. 75, p. 6043-6049, 2003.
- KATZ A,WARIDEL P, SHEVCHENKO A, PICK U. Salt-induced changes in the plasma membrane proteome of the halotolerant alga *Dunaliella salina* as revealed by blue native gel electrophoresis and nano-LC-MS/MS analysis. **Molecular Cell Proteomics**, v. 6, p.1459–1472, 2007.
- KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; SREENATH RAO; REDDY, K.J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, Bangalore, v.88, n.3, p.424-438, 2005.
- KIRCHHOFF, H.; SCHFTTLER, M. A.; MAURER, J.; WEIS, E. Plastocyanin redox kinetics in spinach chloroplasts: evidence for disequilibrium in the high potential chain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1659, p.63– 72, 2004.

- KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to test for induced point mutations in mammals. **Archives of Toxicology**, Heidelberg, Germany, v. 26, p. 231-243, 1975.
- KOLLER, A., WASHBURN, M.P., LANGE, B.M., ANDON, N.L., DECIU, C., HAYNES, P.A., HAYS, L., SCHIELTZ, D., ULASZEK, R., WEI, J., WOLTERS, D., YATES J.R., 3rd,. Proteomic survey of metabolic pathways in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 99, p. 11969–11974, 2002.
- KÖPKE, A. **Proteomics** – a new drug discovery tool. Disponível em: <http://www.wita-proteomics.com>. Acesso em: 01 nov. 2003
- KOUMOTO, Y.; SHIMADA, T.; KONDO, M.; HARA-NISHIMURA, I.; NISHIMURA, M. Chloroplast have a novel cpn10 in addition to cpn as co-chaperonins in Arabidopsis thaliana. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 29688-29694, 2001.
- KRISHNA, R. G. WOLD, F. Post-translational modification of proteins. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 67, p. 265-298, 1993.
- KÜLTZ, D. Evolution of the cellular stress proteome: from monophyletic origin to ubiquitous function. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 18, p. 3119-3124, 2003.
- KÜLTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual Review of physiology**, Palo Alto, v. 67, p. 225-257, 2005.
- KUMAR, S. M. A. B.; TSAI, C. J.; WOLFSON, H.; NUSSINOV, R. Folding funnels and conformational transitions via hinge-bending motions. **Cell Biochemistry and Biophysics**, Totowa, v. 31, p. 141-164, 1999.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.
- LANDELL, M. G. de A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; SILVA, M. de A.; VASCONCELOS, A. C. M. de; BIDOIA, M. A. P.; XAVIER, M. A. et al. **Variedades de cana-deaçúcar para o Centro-Sul do Brasil: 14ª liberação do programa cana IAC (1959-2004)**. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 33, (Série Tecnologia APTA, Boletim Técnico IAC, 195), 2004.
- LANDRY, S. J.; GIERASCH, L. M. Polypeptide interactions with molecular chaperones and their relationship to *in vivo* protein folding. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, Palo Alto, v. 23, p. 645-669, 1994.
- LANGEN, H.; TAKACS, B.; EVERS, S.; BERND, T. P.; LAHM, H. W.; WIPF, B.; GRAY, C.; FOUNTOULAKIS, M. Two-dimensional map of the proteome of *Haemophilus influenzae*. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 21, p. 411-429, 2000.
- LAPOINTE, G.; LUCKEVICH, M. D.; CLOUTIER, M.; SEGUIN, A. 14-3-3- gene family in hybrid poplar and its involvement in tree defense against pathogens. **Journal of Experiment Botany**, Oxford, v. 52, p. 1331-1338, 2001.

- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima-artes & Textos, p. 531, 2000.
- LAWLOR, D. W., CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 275–294, 2002.
- LEA, P.J.; AI-SULAIT, A.; PALMER, S.; DAVIE, W.J. Absorção e metabolismo de nitrogênio sobre estresse hídrico. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O MILHO EM PERSPECTIVA**, 1995. Belo Horizonte, MG. EMBRAPA/CNPMS, 1995. v.1, p.163-194, 1995.
- LEE, S. P., HWANG, Y. S., KIM, Y. J., KWON, K. S., *et al.*, **Journal Biology Chemistry**, v. 276, p. 29826–29832, 2001.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger. **Princípios de Bioquímica**. Tradução de Arnaldo Antônio Simões; Wilson Roberto Navego Lodi. 3ed. São Paulo, Sarvier, 2002.
- LEERS, A. BURD, S.; LOMANIEC, E.; DROBY, S.; CHALUTZ, E. The expression of a grapefruit gene encoding an isoflavone reductase-like protein is induced in response to UV irradiation. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 36, p. 847-856, 1998.
- LEVERSON, J. D.; NESS, S. A. Point mutations in v-Myb disrupt a cyclophilin catalyzed negative regulatory mechanism, **Molecular cell**, v.1, p. 203-211, 1998.
- LI, K.; XU, C.; ZHANG, K.; YANG, A. and ZHANG J. Proteomic analysis of roots growth and metabolic changes under phosphorus deficit in maize (*Zea mays* L.) plants. **Proteomics**, v. 7, p. 1501–1512, 2007.
- LIN, J. H.; LI, H.; YASUMURA, D.; COHEN, H. R.; ZHANG, C.; PANNING, B.; SHOKAT, K. M.; LaVAIL, M. M.; WALTER, P. IRE1 signaling affects cell fate during the unfold protein response. **Science**, v. 318, p. 944-949, 2007.
- LIU, D. L.; HEYLAR, K. R. Simulation of seasonal stalk water content and fresh weigh yield of sugarcane. **Field Crops Research**. v.82, p.59-73, 2003.
- LIU, F.; JESEN, C. R.; ANDERSEN, M. N. Hydraulic and chemical signals in the control of leaf expansion and stomatal conductance in soybean exposed to drought stress. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 65-73, 2002.
- LIU, J.; SRIVASTAVA, R.; CHE, P.; HOWELL, S. H. Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmatic reticulum stress signaling. **The Plant Journal**, v. 51, p. 897-909, 2007.
- LOPEZ, M. F. Proteome analysis I. Gene products are where the biological action. **Journal of chromatography**, Amsterdam, v. 722, n. 1, p. 191-202, 1999.
- MAGALHÃES, C. S.; ARRUDA, M. A. Z. **Sample preparation for metalloprotein analysis: a case study using horse chestnuts**, *Talanta*, v. 71, p. 1958-1963, 2005.

- MANSOUR, M.M.F. fonte Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. **Biologia Plantarum**, v.43, p.491-500, 2000.
- MARCH, R. E. An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 32, n. 4, p. 351-369, 1997.
- MAROUGA, R.; DAVID, S.; HAWKINS, E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 3, p. 669-678, 2005.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007.
- MAULE, R. F.; MAZZA, J. A.; MARTHA JUNIOR, G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58; n. 2, p. 295-301, 2001.
- MAYNARD, D. M.; MASUDA, J.; YANG, X.; KOWALAK, J. A.; MARKEY, S. P. Characterizing complex peptide mixtures using a multi-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry system: *Saccharomyces cerevisiae* as a model system. **Journal of Chromatography**, B810, p. 69-76, 2004.
- MEYER, G. G.; SCHNARRENBERGER, C.; CERFF, R.; MARTIN, W. Molecular characterization of a novel, nuclear-encoded, NAD (+)-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in plastids of the gymnosperm *Pinus sylvestris*. **Plant Molecular Biology**, Boston, n. 26, v. 4, p. 1155-66, 1994.
- MEYER, W.S.; GREEN, G.C. Water use by wheat and plant indicator of available soil water. **Agronomy Journal**, Madison, v.72, p.253-257, 1980.
- MONTRICHARD, F.; ALKHALFIOUI, F.; YANO, H.; VENSEL, WILLIAM H.; HURKMAN, W. J.; BUCHANAN, B. B. Thioredoxin targets in plants: The first 30 years. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 452-474, 2009.
- NAKANO R, ISHIDA H, MAKINO A, MAE T. In vivo fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species in an intact leaf of cucumber under chilling-light conditions. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, p. 270-276, 2006.
- NANDAKUMAR M. P; SHEN J, RAMAN B; MARTEN M. R. Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis. **Journal Proteome**, v. 2, p. 89- 93, 2003.
- NATERA, S. H. A.; GUERREIRO, N.; DORDJEVIC, M. A. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 13, n. 9, p. 995-1009, 2000.

- NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.23, p.12-18, 2001.
- NEPOMUCENO, A. L.; STEWART, J. M. B. OOSTERHUIS, D. M. TURLEY, R.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 23, p. 12-18, 2001.
- NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B. Isolation of a cotton NADP (H) oxidase homologue induced by drought stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 1407-1416, 2000.
- ODA, Y.; HASEZAWA, S. Cytoskeletal organization xylem cell differentiation. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 119, p. 167-177, 2006.
- O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, USA, V. 270, P. 4007-4021, 1975.
- ORLANDO FILHO, J.; MACEDO, N.; TOKESHI, H. Seja o Doutor do seu Canavial. **ARQUIVO DO AGRÔNOMO N°6 – Encarte: INFORMAÇÕES AGRÔMICAS**, n. 67, p. 1-17, 1994.
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study and genomes. **Nature**. London, v. 405, p. 837-845, 2000.
- PARRY M. A. J.; ANDRALOJIC P. J.; KHAN S.; LEA P. J.; KEYS A. J. Rubisco activity: effects of drought stress. **Annals of Botany**, v. 89, p. 833–9, 2002.
- PARSONS, M.; FURUYA, T.; PAL, S.; KESSLER, P. Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 115, p. 19-28, 2001.
- PATTERSON, J.; FORD, K.; CASSIN, A.; NATERA, S.; BACIC, A. Increased abundance of proteins involved in phytosiderophore production in boron-tolerant barley. **Plant Physiology**, v. 144, p. 1612–1631, 2007.
- PATTERSON, S. D. AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature Genetics**, New York, v. 33, p. 311-323, 2003.
- PAUL, W. Electromagnetic traps for charged and neutral particles. **Angewandte Chemie**, International Edition, v. 29, n. 7, p. 739-748, 1990.
- PEREIRA, L. F. P. et al. Ethylene production and ascorbic acid oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 3, jul./set. 2005.
- PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, New York, v. 20, n. 18, p. 6551-6567, 1999.

- PETRUCCO, S.; BOLCHI, A.; FORONI, C.; PERCUDANI, R.; ROSSI, G. L. OTTONELLO, S. A maize gene encoding an NADPH binding enzyme highly homologous to isoflavone reductases is activated in response to sulfur starvation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 69-80, 1996.
- PIMENTEL, C.; ROSSIELO, R.O.P. **Entendimento sobre relações hídricas**. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O MILHO EM PERSPECTIVA, 1995, Belo Horizonte, MG. EMBRAPA/CNPMS, v.1, p.131-146, 1995.
- PLOMION, C.; LALANNE, C.; CLAVEROL, S.; MEDDOUR, H.; KOHLER, A.; BOGEAT-TRIBOULOT M.; BARRE A.; PROVOST, G. L.; DUMAZET, H.; JACOB, D.; BASTIEN C.; DREYER, E.; DARUVAR, A.; GUEHL, J.; SCHMITTER J.; MARTIN, F. and BONNEU, M. Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. **Proteomics**, v. 6, p. 6509–6527. 2006.
- PLOMION, C.; PIONNEAU, C.; BRACH, J.; COSTA, P.; BAILLERES, H. Compression wood-responsive proteins in developing xylem of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) **Plant Physiology**, v. 123, p. 959-969, 2000.
- POCKLEY, A. G.; BULMER, J.; HANKS, B. M.; WRIGHT, B. H. Identification of human heat shock protein 60 (HSP 60) and anti-HSP 60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. **Cell Stress e Chaperones**, v. 4, p. 29-35, 1999.
- PORUBLEVA, L.; VELDEN, K.; KOTHARI, S.; OLIVER, D.; CHITNIS, P. The proteome of mayze leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptides mass fingerprints. **Electrophoresis**, New York, v. 22, p. 1724-1738, 2001.
- QUADRONI, M.; JAMES, P. Enhancing high-throughput proteome analysis: the impact of stable isotope labeling. In: PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J. (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. Bios Scientific Publishers Limited, p. 151-169, 2001.
- RITCHIE, J.T.; BURNETT, E.; HENDERSON, R.C. Dryland evaporative flux in a subhumid climate. 3. Soil water influences. **Agronomy Journal**, Madison v.64, p.168-173,1972.
- ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R.; COUTINHO, M. V.; PAES, N. S.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-de-SÁ, M. F. **Comunicado Técnico: Eletroforese bidimensional e Análise de proteomas**. Disponível em: <http://www.cernagem.embrapa.br/publica/trabalhos/cot136.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2010.
- ROSE, J.K.C.; BASHIR. S.; GIOVANONI. J.J.; JAHN, M.M.; SARAVANAN, R.S. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. **The Plant Journal**, v. 39, p. 715-733, 2004.

- ROSENTHAL, W.D.; ARKIN, G.F.; SHOUSE, P.L. et al. Water deficit effects on transpiration and leaf growth. **Agronomy Journal**, Madison, v.79, p.1019-1026, 1987.
- SACILOTO, R.F.Z. **Inserção do gene *pr5k* em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala***. Piracicaba, 74p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2003.
- SAHNOUN, I.; DÉHAIS, P.; MONTAGU, M.V.; ROSSIGNOL, M.; ROUZÉ, P. P. A plant plasma membrane database. **Journal Biotechnology**, v. 78, p. 235-246, 2000.
- SAIRAM, R. K. and TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, vol. 86, n. 3, 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.
- SALEKDEH, G. H.; KOMATSU, S. Crop proteomics: aim at sustainable agriculture of tomorrow. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 2976-2996, Aug. Issue 16, 2007.
- SANTONI, V., ROUQUIE, D., DOUMAS, P., MANSION, M., BOUTRY, M., DEGAND, H., DUPREE, P., PACKMAN, L., SHERRIER, J., PRIME, T., BAUW, G., POSADA, E., ROUZE, P., DEHAIS, P., SAHNOUN, I., BARLIER, I., ROSSIGNOL, M. Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. **Plant Journal**, v. 16, p. 633–64, 1998.
- SARAVANAN R. S; ROSE J. K. C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, v. 4, p. 2522–2532, 2004.
- SATO, Y.; YOKOYA, S. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-to-shock protein, sHSP17.7. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 329-334, 2008.
- SAUER, M.; JAKOB, A.; NORDHEIM, A. and HOCHHOLDINGER, F. Proteomic analysis of shoot-borne root initiation in maize (*Zea mays* L.). **Proteomics**, v. 6, p. 2530–2541, 2006.
- SCANDALIOS, J. G. **Oxidative Stress and Molecular Biology of Oxidant Defense**, Harbor: Cold Spring Laboratory Press, p. 890, 1997.
- SHAO, H.; CHU, L.; JALEEL, C. A.; ZHAO, C. Water-deficit stress induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, p. 215-225, 2008.
- SHEN, S. et al. A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. **Journal of Biochemistry**, v.132, p.613-620, 2002.

- SCHMELZER, E. Cell polarization, a crucial process in fungal defence. **Trends in Plant Sciences**, Oxford, v. 7, p. 411-415, 2002.
- SCHWARTZ, J. C.; SENKO, M. W.; SYKA, J. E. P. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 13, n. 6, p. 659-669, 2002.
- SEAG-ES. **Cana-de-açúcar**. Secretaria de Agricultura do Espírito Santo. Disponível em: [HTTP://www.seag.es.gov.br/setores/cana-de-açúcar/?cd\\_matia=88&site=53](http://www.seag.es.gov.br/setores/cana-de-açúcar/?cd_matia=88&site=53). Acesso em: 25 jan. 2010.
- SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.333-341, 2002.
- SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850-858, 1996.
- SHOJI, T.; WINZ, R.; IWASE, T.; NAKAJIMA, K.; YAMADA, Y.; HASHIMOTO, T. Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 50, p. 427-440, 2002.
- SHULTZ, H.R.; MATTEWS, M.A. Growth, osmotic adjustment, and cell-wall mechanics of expanding grape leaves during water deficits. **Crop Science**, Madison, v.33, p. 287-294, 1993.
- SIDDIQUE, M. R. B.; HAMID, A.; ISLAM, M. S. Drought stress effects on water relations of wheat. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 45, p. 31-39, 2000.
- SILVEIRA, J.A.G.; VIÉGAS, R.A.; ROCHA, I.M.A.; MOREIRA, A.C.O.M.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.115-123, 2003.
- SMAILOV, S.; LEE, A. V.; ISKAKOV, B. K. Study of phosphorylation of translation elongation factor 2 (EF-2) from wheat germ. **Federation of European Biochemical Societies**, Amsterdam, v. 321, n. 2, p. 219-223, 1993.
- SOARES, C. Q. G. **Proteômica diferencial e caracterização fisiológica de dois clones de *Coffea canephora* sob déficit hídrico**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, p. 110. Tese (Mestrado), 2008.
- SOUSA, J.A.G.C. **Efeito da tensão da água do solo na cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. Limeira, Universidade Estadual de Campinas, p. 163, Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1976.

- SOUZA, S. L. **Análises do proteoma de raízes de cana-de-açúcar e da expressão de uma peroxidase apoplástica responsiva à micorriza arbuscular.** Tese Doutorado, p. 100, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2006.
- SPREITZER, R. J.; SALVUCCI, M. E. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. **Nature**, London, v. 337, p. 229-234, 2002.
- STRIGER, C. J. Signaling to the actin cytoskeleton in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 257-288, 2000.
- STTEN, H.; MANN, M. The ABC'S (and XYZ'S) of peptide sequencing. **Nature reviews**, London, v. 5, p. 699-771, 2004.
- SU, P.; LI, H. Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. **Plant Physiology**, v. 146, p. 1231-1241, 2008.
- SUGIHARTO, B., N. ERMAWATTY, H. MORI, K. AOKI, K. YONEKURA-SAKAKIBARA, T. YAMAYA, T. SUGIYAMA and H. SAKAKIBARA. Identification and characterization of a gene encoding drought-inducible protein localizing in the bundle sheath cell of sugarcane. **Plant Cell Physiology**, v. 43, p. 350-354, 2002.
- SUN, W.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. **Biochemistry Biophysics Acta**, v. 1577, p. 1-9, 2002.
- SUNG, D. Y.; GUY, C. L. Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in Arabidopsis. Evidence for pleiotropic consequences. **Plant Physiology**, v. 1332, p. 979-987, 2003.
- SUNG, D. Y.; KAPLAN, F.; GUY, C. L. Plant Hsp 70 molecular chaperones: protein structure, gene family, expression and function. **Physiology Plant**, v. 113, p. 443-451, 2001.
- SURESH, S. et al. Proteomic resources: Integrating biomedical information in humans. **Gene**, v. 364, p. 13-18, 2005.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 3. Ed. – Porto Alegre: Artmed. p. 139-145, 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER. **Plant Physiology**. California: The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc., Redwood City, 1991.
- TIMPERIO, A. M.; EGIDI, M. G.; ZOLLA, L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). **Journal of Proteomics**, v. 71, p. 391-411, 2008.
- TOUZET, P., RICCARDI, F., MORIN, C., DAMERVAL, C., HUET, J.-C., PERNOLLET, J.-C., ZIVY, M., DE VIENNE, D., The maize two dimensional gel protein database: towards an integrated genome analysis program. **Theoretical Applied and Genetics**, v. 93, p. 997-1005, 1996.

- TSUGITA, A., AND M. KAMO. 2-D electrophoresis of plant proteins. **Methods Molecular Biology**, v. 112, p. 95–97, 1999.
- TUBEROSA, R.; SANGUINETI, M.C.; LANDI, P. Abscisic acid concentration in leaf and xylem sap, leaf water potential, and stomatal conductance in maize. **Crop Science**, Madison, v. 34, p.1537-1563, 1994.
- TURNER, N.C. Adaptation to water deficits: A changing perspective. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p.175-190, 1986.
- TURNER, N.C. **Further progress in crop water relations**. In Advances in agronomy (D.L. Sparks, ed.). Academic Press, New York, p.293-337, 1997.
- TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 193-197, 2003.
- UMEZAWA, T.; FUJITA, M.; FUJITA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 113-122, 2006.
- UNLU, M.; MORGAN, M. E.; MINDEN, J. S. Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. **Electrophoresis**, v. 18, n.11, p. 2071-2077, 1997.
- VAN EDEN, W.; VAN DER Z. R.; PAUL, A. G. A.; PRAKKEN, B. J.; WENDLING, U. W.; ANDERTON, S. M.; WAUBEN, M. H. M. Do heat shock proteins control the balance of t-cell regulation in inflammatory disease. **Immunology Today**, v. 19, p. 303-307, 1998.
- van der WEEL, C.M.; SPOLLEN, W.F.; SHARO, R.E.; BASKIN, T.I. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. **Journal Experimental Botanica**, v. 51, p. 1555–1562. 2000.
- VERBI, F. M.; ARRUDA, S. C. C.; RODRÍGUEZ. A. P. M.; PÉREZ, C. A.; ARRUDA, M. A. Z. Metal-binding proteins scanning and determination by combining gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry. **Journal Biochemistry Biophysics Methods**, v. 62, p. 97-109, 2005.
- VETTORE, A. L.; SILVA, F. R.; KEMPER, E. L. et I. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 1-7, 2001.
- VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome Project: EST-based genomic resource. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 95-108, 2006.
- VU J. C. V.; GESCH R. W.; ALLEN L. H.; BOOTE K. J.; BOWES G. CO<sub>2</sub> enrichment delays a rapid, drought- induced decrease in Rubisco small subunit transcript abundance. **Journal Plant Physiology**, p.155, p. 139–42, 1999.

- WAN, J.; TORRES, M.; GABAPATHY, A.; THELEN, J.; DAGUE, B. B.; MOONEY, B.; XU, D.; STACEY, G. Proteomic analysis of soybean root hairs after by *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 18, n. 5, p. 458-467, 2005.
- WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in abiotic stress response, **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 244–252, 2004.
- WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN A. **Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance plants**, v. 218, p.1-14, 2003.
- WASINGER, V. C. CORDWELL, S. J. CERPA-POLJAK, A.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; WILKINS, M. R.; DUNCAN, M. W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K. L.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 16, p. 1090-1094, 1995.
- WATSON, B.S., ASIRVATHAM, V.S., WANG, L., SUMMER, L.W. Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). **Plant Physiology** 131, 1104–1123, 2003.
- WIJK, K. J. V. Challenges and prospects of plants Proteomics. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 126, n. 2, p. 501-508, 2001.
- WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Aspectos fisiológicos do estresse salino em plantas. In: Eds. NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. T. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**, p. 118-126, 2005.
- WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, Newcastle, v. 13, p. 19-50, 1995.
- XIÃO, X.; YANG, F.; ZHANG, S.; KORPELAINEN, H. and LI, C. Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. **Physiologia Plantarum**, v. 136, p150–168, 2009.
- XIONG, L.; SCHUMACKER, K.S.; ZHU, J. Cell signaling during cold, drought and salt stress. **The Plant Cell**, p. 165–183, 2002.
- XU, C.; SULLIVAN, J. H.; GARRETT, W. M.; CAPERNA T. J. and NATARAJAN, S. Impact of solar ultraviolet-B on the proteome in soybean lines differing in flavonoid contents. **Phytochemistry**, v. 69, p. 38–48, 2008.
- XU, G.; LI, C.; YAO, Y. Proteomics Analysis of Drought Stress-Responsive Proteins in *Hippophae rhamnoides* L. **Plant Molecular Biology**, v. 27, p. 153–161, 2009.

- YAN, S.P.; ZHANG, Q. Y.; TANG, Z. C.; SU, W. A. and SUN, W.N. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Mol. Cell. Proteomics*, v. 5, p. 484–496, 2006.
- YIN, L.; TAO, Y.; ZHAO, K.; SHAO, J.; LI, X.; LIU, G.; LIU, S. and ZHU, L. Proteomic and transcriptomic analysis of rice mature seed-derived callus differentiation. *Proteomics*, v. 7, p. 755–768, 2007.
- ZEEVAART, Z.R.; CREELMAN, R.A. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review Plant Physiology*, v.39, p.439-473, 1988.
- ZENOBI, R.; KNOCHENMUSS, R. Ion formation in MALDI Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 17, n. 5, p. 337-366, 1998.
- ZHANG, J.; MA, H.; CHEN, S.; JI M.; PERL, A.; KOVACS, L.; CHEN, S. Stress response proteins' differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon — A proteomic approach. *Plant Science*, v. 177, p. 103–113, 2009.
- ZHANG, H.; WANG, J.; NICKEL, U.; ALLEN, R.; GOODMAN, H. M. Cloning and expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. *Plant Molecular Biology*, Boston, v. 34, p. 967-971, 1997.
- ZHANG, X.; TAKANO, T.; LIU, S. Identification of mitochondrial ATP synthase small subunit gene (RMtATP6) expressed in response to salts and osmotic stresses in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 57, n. 1, p. 193-200, 2006.
- ZHOU, G.; LI, H.; DeCAMP, D.; CHEN S.; SHU, H.; GONG, Y.; FLAIG, M.; GILLESPIE, J. W.; HU, N.; TAYLOR, P. R.; EMMERT-BUCK, M. R.; LIOTTA, L. A.; PETRICON, E. F.; ZHAO, Y. 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. *Molecular and Cellular Proteomics*, v. 1, n. 2, p. 117-124, 2002.
- ZHU, J.K. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biology*, v.4, p.401-406, 2001.
- ZHU, J.K.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Molecular aspects of osmotic stress. *Critical Reviews Plant Science*, v.16, p. 253–277, 1997.