UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUACÃO EM GENÉTICA

CINTHYA MIRELLA PACHECO

ANÁLISE PROTEÔMICA ASSOCIADA À RESPOSTA À SALINIDADE EM RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)

RECIFE

2012

CINTHYA MIRELLA PACHECO

ANÁLISE PROTEÔMICA ASSOCIADA À RESPOSTA À SALINIDADE EM RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior
Coorientador: Prof. Dra. Rejane J. Mansur C. Nogueira
Prof. Dra. Maria Clara Pestana Calsa

RECIFE
2012

Pacheco, Cinthya Mirella
Análise proteômica associada à resposta à salinidade em raízes de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)/ Cinthya Mirella Pacheco. – Recife: O Autor, 2012.

141 folhas : il., fig., tab.
Orientador: Tercilio Calsa Junior
Coorientador: Rejane J. Mansur C. Nogueira e Maria Clara Pestana Calsa
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Genética e Biologia Molecular, 2012.
Inclui bibliografia e anexos

1. Cana de Açúcar 2. Salinidade dos solos 3. Peptídeos I. Calsa Junior, Tercilio II. Nogueira, Rejane J. Mansur C. III. Calsa, Maria Clara Pestana IV. Título

572.65 CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2012-129

CINTHYA MIRELLA PACHECO

ANÁLISE PROTEÔMICA ASSOCIADA À RESPOSTA À SALINIDADE EM RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* spp.)

APROVADO EM 02/03/2012

BANCA EXAMINADORA:

Orientador: Tercilio Calsa Junior, Dr., UFPE

1º Examinador: Antonio Vargas de Oliveira Figueira, Dr., USP

2º Examinador: Ana Maria Benko Iseppon, Dr., UFPE

3º Examinador: Lilia Gomes Willadino, Dr., UFRPE

Coorientadora: Rejane J. Mansur C. Nogueira, Dr., UFRPE

Coorientadora: Maria Clara Pestana Calsa, Dr., UFPE

RECIFE
2012

Aos meus pais (Maria e Raul), irmão (Bruno) e companheiro de todas as horas (Thiago) pelo carinho e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força que me permitiu continuar e chegar ao término do trabalho.

Ao meu orientador, Professor Tercilio Calsa Jr., primeiramente por ter me dado esse projeto de presente e por ter me ensinado não só assuntos relativos ao trabalho, mas principalmente pela confiança que sempre depositou em mim desde os primeiros dias que conversamos, pela força, paciência, incentivo para continuar e pela amizade que conseguimos construir nesse tempo. Além de conselhos e ensinamentos falados que levarei para o resto da vida.

Às minhas coorientadoras, Rejane Mansur e Maria Clara Pestana Calsa, pela dedicação, ensinamentos, conselhos e também amizade ao longo desses dois anos.

Aos meus pais, Maria e Raul, pelo apoio incondicional, em todos os momentos da minha vida. Se não fosse por eles não conseguiria fazer o que fiz.

Ao meu irmão, Bruno, e ao meu noivo Thiago pelo companheirismo e salvação nos finais de semanas nas vindas ao laboratório.

À minha mais nova família LGPP pela ajuda na bancada, conversas, amizade, confiança e principalmente paciência.

À minha família LFV que nunca me abandonou nesses dois anos e sempre que precisei pude contar com eles.

À Nayara Lira (Coração) pela força, principalmente por fazer sair daquela depressão, além de todos os ensinamentos na área da proteômica que sempre me salvaram, seja na bancada ou na escrita.

A Marcelo Oliva, Renata Almeida, Regina Folha, Amanda Rocha, Elton Nunes, Juliana Souza, Renata Oliveira, Taciana Manso e Adauto Neto pela ajuda direta no meu trabalho, além de momentos de risos e choros no laboratório.

À Celuza pelos momentos de alegria.

À EECAC/ UFRPE e RIDESA pelo fornecimento das variedades de cana-de-açúcar utilizadas no experimento;

Ao CNPq, à FACEPE e à UFPE pelo apoio financeiro e estrutura física para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“Aprende-se com as diferenças e não com as igualdades."

(Paulo Freire)

RESUMO

A salinidade dos solos é um fator limitante para o desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar no Brasil, porém as plantas em geral apresentam mecanismos de tolerância variável ao estresse por salinidade. Nestes, pode haver alterações na expressão gênica que se tornam importantes objetos de estudo, que pode ser realizado através de análise proteômica. Assim, o objetivo do trabalho foi identificar peptídeos diferencialmente expressos em plantas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse salino. Para tal, foi conduzido experimento em casa de vegetação com quatro variedades de cana-de-açúcar (RB867515, RB92579, RB72454 e RB855536) e duas condições salinas, 0 mM (controle) e 200 mM de NaCl. As coletas foram realizadas após 2 e 72 h da indução ao estresse por sal, tanto para as análises fisiológicas quanto para a análise proteômica. Os parâmetros fisiológicos avaliados foram: vazamento foliar de eletrólitos, potencial hídrico foliar, teor relativo de água, transpiração, fotossíntese e condutância estomática. Para a análise proteômica, as proteínas totais da folha +1 e raízes foram extraídas, quantificadas e analisadas por eletroforese bidimensional. A análise das imagens dos géis foi realizada em programa computacional onde em cada contraste apenas uma variável foi considerada (condição salina ou variedade). *Spots* diferenciais foram excisados, digeridos com tripsina e somente os de raiz foram identificados via espectrometria de massas. De acordo com os parâmetros fisiológicos, foram selecionadas as variedades RB855536 como a mais sensível à salinidade e a RB867515 como a mais tolerante. Foram observados peptídeos diferencialmente expressos distribuídos nos contrastes em ambas as variáveis (condição salina ou variedade) e órgãos estudados, categorizados por processo biológico e função molecular através de sua ontologia gênica. A variedade tolerante (RB867515) mostrou maior acúmulo de proteínas envolvidas com crescimento, desenvolvimento, metabolismo de carboidratos e energético após 2 h de estresse, indicando que nessas plantas a detecção do fator de estresse parece ativar sinalização para continuar o crescimento radicular, evitando regiões com excesso de íons tóxicos. Por outro lado, foi verificada na variedade sensível a presença dessas proteínas apenas no tratamento após 72 h. Em adição, proteínas envolvidas na metabolização de radicais livres, proteção de proteínas e estabilização de membranas tiveram sua expressão induzida na fase inicial de exposição ao estresse na variedade tolerante, enquanto que na sensível essas proteínas só foram expressas no tratamento após 72 h. Tais resultados sugerem que essas vias de resposta ao estresse são mais eficientes para conferir maior tolerância à salinidade em cana-de-açúcar, e que sua efetividade para a tolerância fenotípica depende da detecção do estresse e ativação precoce da expressão dos genes codificantes.

Palavras-chave: estresse abiótico, peptídeos, raiz, tolerância

ABSTRACT

Soil salinity is a limiting factor to sugarcane crop development in Brazil, although in general plants present variable mechanisms of tolerance to salinity stress. In these, gene expression changes become important study focus, that can be performed through proteomic analysis. Thus, the objective of this work was to identify differentially expressed peptides in sugarcane plants submitted to salinity stress. For that, a greenhouse experiment was established with four sugarcane varieties (RB867515, RB92579, RB72454 and RB855536) and two salt conditions, 0 mM (control) and 200 mM NaCl. Harvests occurred after 2 and 72 h of stress induction by salt, for physiological analyses as well as for proteomics. The evaluated physiological parameters were: leaf electrolytes leakage, leaf water potential, relative water content, transpiration, photosynthesis and stomatal conductance. In proteomic analysis, total proteins from leaf and roots were extracted, quantified and analysed through bidimensional electrophoresis. Gel images analyses were done computational program, where in each contrast only one variable was considered (salinity condition or variety). Differential *spots* were excised, digested by trypsin and only the root-derived were identified via mass spectrometry. According to the physiological parameters, were selected the varieties RB855536 as the most sensitive to salinity, and the RB867515 as the most tolerant. Differentially expressed peptides were observed distributed in the contrasts in both variables (salinity condition or variety) and sampled organs, organised in gene ontology categories by biological process and molecular function. Tolerant variety (RB867515) showed the highest accumulation of proteins involved in growth, development, carbohydrate and energy metabolism after 2 h of stress, indicating that in such plants the detection of stressing factor seems to activate signaling pathways towards keeping root growth, avoiding regions with toxic ions excess. On the other hand, the presence of these proteins in the sensitive variety was verified only in treatment after 72 h. In addition, proteins involved in free radicals metabolization, protein protection and membrane stabilization had their expression induced in the initial phase of stress exposure in tolerant variety, while in sensitive one these proteins were expressed only in treatment after 72 h. Such results suggest that these stress response pathways are more efficient to confer higher tolerance to salinity in sugarcane, and their effectiveness for phenotypical tolerance depends on stress detection and early activation of the coding genes expression.

Key words: abiotic stress, peptides, root, tolerance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da resposta de crescimento de plantas superiores em duas fases em resposta à salinidade. Adaptado de Carillo et al. (2011).....27

Figura 2. Imagens do experimento de cana-de-açúcar sob condições de salinidade em casa de vegetação. A) Propagação por fragmentos de secção transversal em bandejas. B) Plantas com 15 dias após a propagação. C) Transplantio das plantas para vasos de polietileno. D) Visão geral do experimento. 41

Figura 3. Imagens da diferenciação dos tratamentos salinos no experimento de cana-de-açúcar em casa de vegetação. A e B) Visão geral das plantas no dia da realização da coleta. C e D) Coleta da solução drenada e medição da condutividade elétrica.....42

Figura 4. Imagens da coleta de folha e raiz de cana-de-açúcar sob condições de salinidade em casa de vegetação para a análise proteômica. A) e B) Coleta da folha +1. C) e D) Coleta da raiz. E) Material coletado imerso em nitrogênio líquido. 46

Figura 5. Representação da tabela de análises dos géis no programa Image Master 2D Platinum v7.0 (GE Life Sciences) onde *File Name* corresponde ao nome do gel, *Spot* ID é a identificação de cada *spot*, *Match* ID é um número atribuído a cada comparação nos géis contrastantes (*Match*), pI o ponto isoelétrico do *spot*, MW corresponde a massa molecular e %Vol é a porcentagem de volume do *spot* no gel. 51

Figura 6. Representação da tabela de análises de classes no programa Image Master 2D Platinum v7.05 (GE Life Sciences) onde: *Match* ID é um número atribuído a cada *spot* na comparação nos géis contrastantes (*Match*); Ratio corresponde à razão de variação entre a %Vol dos dois *spots* correspondentes em um *match,* indicado na coluna *Max*; o sinal de "-" representa que a proteína é menos expressa nessa condição e o Anova a porcentagem de erro para cada comparação dos *spots* diferencialmente expressos.....52

Figura 7. Quantificação através do método Bradford (1976) de proteínas totais de raiz das variedades de cana-de-açúcar RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível)

cultivada em casa de vegetação após 2 e 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. 60

Figura 8. Gel SDS-PAGE (poliacrilamida 12,5%) de proteínas de raiz de cana-de-açúcar. A) variedade RB867515 (tolerante), e (B) variedade RB855536 (sensível) cultivadas em casa de vegetação após 2 e 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. MM: Marcador Molecular (KDa); 1 - 3: 3 repetições do tratamento 0 mM; 4 – 6: 3 repetições do tratamento 200 mM (após 2 h de estresse); 7 - 9: 3 repetições do tratamento 200 mM (após 72 h de estresse). 61

Figura 9. Géis 2D (poliacrilamida 12,5%) de proteínas totais de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) sob salinidade cultivada em casa de vegetação corados com Coomassie blue. As proteínas (60 µg) foram separadas em fitas IPG de 11 cm com pH de 3 a 10. A) 0 mM de NaCl. B) Após 2 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. C) Após 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. 63

Figura 10. Géis 2D (poliacrilamida 12,5%) de proteínas totais de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB855536 (sensível) sob salinidade cultivada em casa de vegetação coradas com Coomassie blue. As proteínas (60 µg) foram separadas em fitas IPG de 11 cm com pH de 3 a 10. A) 0 mM de NaCl. B) Após 2 h de exposição ao estresse por 200 mM de NaCl. C) Após 72 h de exposição ao estresse por 200 mM de NaCl. 64

Figura 11. Valores médios do número total de *spots*, *spots* comuns e exclusivos de três réplicas biológicas para cada condição salina de raiz de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) sob estresse por 200 mM de NaCl, após 2 e 72 h de exposição ao sal. 66

Figura 12. Análise comparativa entre os géis de raiz da variedade de cana-de-açúcar RB867515 (tolerante) sob estresse por 200 mM de NaCl cultivada em casa de vegetação. A) 0 mM de NaCl x B) 200 mM de NaCl após 72 h de exposição ao estresse (Gradiente de 11 cm). *Spots* envoltos com a cor verde: comuns as duas condições; *spots* envoltos com a cor vermelha: exclusivos de uma condição. 68

Figura 13. Análise comparativa entre os géis de raiz da variedade de cana-de-açúcar RB855536 (sensível) sob estresse por 200 mM de NaCl cultivada em casa de vegetação. A) 0 mM de NaCl x B) 200 mM de NaCl após 72 h de exposição ao estresse (Gradiente de 11 cm). *Spots* envoltos com a cor verde: comuns as duas condições; *spots* envoltos com a cor vermelha: exclusivos de uma condição. 69

Figura 14. Total de *spots* diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) cultivada em casa de vegetação sob estresse por 200 mM de NaCl. Foram selecionados para digestão e identificação os *spots* que apresentaram a razão da %Vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05...70

Figura 15. Total de *spots* diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) X RB855536 (sensível) sob estresse por 200 mM de NaCl cultivadas em casa de vegetação. Foram selecionados para digestão e identificação os *spots* que apresentaram a razão da %Vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05...71

Figura 16. Distribuição dos peptídeos diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) e sensível (RB855536) em condições de salinidade de acordo com sua anotação no GO.....73

Figura 17. Porcentagem de peptídeos diferencialmente expressos de raiz das variedades RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) que apresentaram sua expressão induzida ( ) ou inibida ( ) sob estresse por 200 mM de NaCl após 2 h e 72 h de exposição. 75

Figura 18. Peptídeos de raiz de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) que apresentaram sua expressão inibida (-) ou induzida (+) em condições de salinidade por 200 mM de NaCl de acordo com sua anotação no GO. 76

Figura 19. Representação de 15 *spots* dos 17 *spots* diferencialmente expressos em géis de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) em condições de salinidade cultivadas em casa de vegetação. 81

Figura 20. Porcentagem de volume dos peptídeos diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) sob estresse por 200 mM de NaCl (após 2 h e 72 h) cultivadas em casa de vegetação. 82

Figura 21. Representação de 21 *spots* dos 22 *spots* diferencialmente expressos em géis de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB855536 (sensível) em condições de salinidade cultivadas em casa de vegetação. 86

Figura 22. Porcentagem de volume dos peptídeos diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB855536 sob estresse por 200 mM de NaCl (após 2 h e 72 h) cultivadas em casa de vegetação. 87

Figura 23. Atividade da superóxido dismutase em raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) sob estresse por 200 mM de NaCl cultivadas em casa de vegetação. 90

Figura 24. Representação esquemática da expressão de proteínas de raiz de cana-de-açúcar sob salinidade cultivada em casa de vegetação. Adaptado de fonte: http://anaejeni.blogspot.com/2010_11_01_archive.html. 102

Figura 25. Representação esquemática temporal da expressão de proteínas de raiz de cana-de-açúcar sob salinidade cultivada em casa de vegetação. Setas verdes para cima: expressão induzida na proteína da variedade RB867515 (tolerante); setas verdes para baixo: expressão inibida na variedade RB867515 (tolerante); setas laranja para cima: expressão induzida da proteína na variedade RB855536 (sensível); setas laranja para baixo: expressão inibida na variedade RB855536 (sensível).....103

Figura 26. Nível de expressão das diferentes classes de SOD e atividade enzimática da superóxido dismutase (geral) em raiz de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) sob estresse por 200 mM de NaCl cultivadas em casa de vegetação. 106

Figura 27. Quantificação através do método Bradford (1976) de proteínas totais de folha das variedades de cana-de-açúcar RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) cultivadas em casa de vegetação após 2 e 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl.....123

Figura 28. Gel SDS-PAGE (poliacrilamida 12,5%) de proteínas de folha de cana-de-açúcar. A) variedade RB867515 (tolerante), e (B) variedade RB855536 (sensível) cultivadas em casa de vegetação após 2 e 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. MM: Marcador Molecular (KDa); 1 - 3: 3 repetições do tratamento 0 mM; 4 – 6: 3 repetições do tratamento 200 mM (após 2 h de estresse); 7 - 9: 3 repetições do tratamento 200 mM (após 72 h de estresse). 124

Figura 29. Géis 2D (poliacrilamida 12,5%) de proteínas totais corados com Coomassie blue de folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) sob salinidade cultivada em casa de vegetação. As proteínas (200 µg) foram separadas em fitas IPG de 11 com pH de 3 a 10. A) 0 mM de NaCl. B) Após 2 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. C) Após 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. 126

Figura 30. Géis 2D (poliacrilamida 12,5%) de proteínas totais corados com Coomassie blue de folha de cana-de-açúcar da variedade RB855536 (sensível) sob salinidade cultivada em casa de vegetação. As proteínas (200 µg) foram separadas em fitas IPG de 11 com pH de 3 a 10. A) 0 mM de NaCl. B) Após 2 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. C) Após 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. 127

Figura 31. Valores médios do número total de *spots*, *spots* comuns e exclusivos de três réplicas biológicas de folha de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante à seca) e RB855536 (sensível) para cada tratamento analisado.....129

Figura 32. Análise comparativa entre as amostras de folha da variedade de cana-de-açúcar RB867515 (tolerante) cultivada em casa de vegetação. A) 0 mM de NaCl x B) 200 mM de NaCl após 72 h de exposição ao estresse (Gradiente de 11 cm). *Spots*

envoltos com a cor verde: comuns as duas condições; *spots* envoltos com a cor vermelha: exclusivos de uma condição. 131

Figura 33. Análise comparativa entre as amostras de folha da variedade de cana-de-açúcar RB855536 (sensível) cultivada em casa de vegetação. A) 200 mM de NaCl (após 2 h de exposição ao estresse) x B) 200 mM de NaCl (após 72 h de exposição ao estresse) (Gradiente de 11 cm). *Spots* envoltos com a cor verde: comuns as duas condições; *spots* envoltos com a cor vermelha: exclusivos de uma condição. 132

Figura 34. Total de *spots* diferencialmente expressos de folha de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) cultivada em casa de vegetação sob estresse por 200 mM de NaCl. Foram selecionados para digestão e identificação, os *spots* que apresentaram a razão da %Vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05. 133

Figura 35. Total de *spots* diferencialmente expressos de folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) X RB855536 (sensível) sob estresse por 200 mM de NaCl cultivadas em casa de vegetação. Foram selecionados para digestão e identificação os *spots* que apresentaram a razão da %Vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05. 134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das variedades pré-selecionadas de cana-de-açúcar de acordo com a tolerância à seca, exigência em ambiente, teor de sacarose e teor de fibras. 40

Tabela 2. Comparações (matches) analisadas no programa Image Master 2D Paltinum v7.05 (GE Life Sciences). 50

Tabela 3. Valores médios de vazamento de eletrólitos (VE), teor relativo de água (TRA), potencial hídrico foliar (Ψwf), fotossíntese líquida (A), transpiração foliar (E) e condutância estomática (gs) em quatro variedades de cana-de-açúcar RB92579 e RB867515 (tolerantes à seca), RB72454 e RB855536 (sensíveis à seca) cultivadas em casa de vegetação após 2 e 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. Letras iguais e minúsculas entre as variedades e maiúsculas entre os tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 57

Tabela 4. Total de spots comuns e exclusivos de raiz de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) para cada comparação de géis analisadas no programa Image Master 2D Platinum v7.05 (GE Life Sciences). 67

Tabela 5. Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol ≥ 1,5 para cada variedade RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível). 72

Tabela 6. Anotação dos peptídeos diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) em condições de salinidade.....79

Tabela 7. Peptídeos diferencialmente expressos conforme sua presença (+) ou ausência (-) em raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) em condições de salinidade. 80

Tabela 8. Anotação dos peptídeos diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB855536 (sensível) em condições de salinidade. 84

Tabela 9. Peptídeos diferencialmente expressos conforme sua presença (+) ou ausência (-) em raiz de cana-de-açúcar da variedade RB855536 (sensível) em condições de salinidade. 85

Tabela 10. Anotação dos peptídeos diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da comparação RB867515 (tolerante) x RB855536 (sensível) em condições de salinidade após 2 h de exposição ao estresse. 88

Tabela 11. Anotação dos peptídeos diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da comparação RB867515 (tolerante) x RB855536 (sensível) em condições de salinidade após 72 h de exposição ao estresse. 89

Tabela 12. Total de spots comuns e exclusivos de folha de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante à seca) e RB855536 (sensível) para cada comparação analisada. 130

Tabela 13. Pares de iniciadores das proteínas diferencialmente expressas de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) em condições de salinidade..136

Tabela 14. Pares de iniciadores das proteínas diferencialmente expressas de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB855536 (sensível) em condições de salinidade. .137

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Sigla	Definição
%Vol	Porcentagem de volume do *spot* normalizado em gel
Ψ_{wf}	Potencial hídrico foliar
2D-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional
A	Fotossíntese
ABA	Ácido abscísico
ADF3	Fator de depolimerização de actina 3
APRT	Adenina fosforibosiltransferase
ATP	ATP sintase subunidade alfa
BSA	Albumina de soro bovino
CDC48	Proteína de ciclo de divisão celular 48
CE	Condutividade elétrica
CHAPS	Cloroamidopropil dimetilamônio propano sulfonato
CIB	Conselho de Informações sobre Biotecnologia
Cu-Zn SOD	Superóxido dismutase Cu-Zn
DEPs	Peptídeos diferencialmente expressos
DM	Danos na membrana
DTT	Ditiotreitol
E	Transpiração
EECAC	Estação experimental de cana-de-açúcar do Carpina
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
ESTs	*Expressed sequence tags*, ou regiões de sequências expressas
FAO	*Food and Agriculture Organization*, Organização para Alimentação e Agricultura
FBA	Frutose bifosfato aldolase
FrK2	Frutoquinase-2
GAPDH	Gliceraldeído desidrogenase 3 fosfato
GO	Ontologia gênica
Gs	Condutância estomática
GS	Glutamina sintetase

IAA	Iodoacetamida
IEF	Focalização isoelétrica
IPG	pH imobilizado em gradiente
MM	Massa molecular
Mn-SOD	Superóxido dismutase [Mn]
MS	Espectrometria de massas
MetS	Metionina sintase
O_2^-	Radical superóxido
OH^-	Radical hidroxila
PAL	Fenilalanina amônia-liase
PGK	Fosfoglicerato quinase
pI	Ponto isoelétrico
PMF	Peso da massa fresca
PMS	Peso da massa seca
PMT	Peso da massa túrgida
PR-10	Proteína relacionada a patogênese 10ª
RCA	RuBisCO activase
RIDESA	Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro
RPL12	Proteína ribossomal 40S S12
Rubisco	Ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase
SAMS3	S - adenosilmetionina sintetase
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
SOS	*Salt-overly-sensitive*, super-sensibilidade a sais
SS2	Sacarose sintase 2
TPI	Isomerase triosefosfato citosólica
TRA	Teor relativo de água
UPLC-ESI-Q-TOF	Espectrômetro de massas com *eletrospray* e tempo de vôo acoplado à cromatrografia de ultra performace
VE	Vazamento de eletrólitos
Wrba	Flavoproteína wrbA

YLP	*Yucca* leaf protein

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22
2 REVISÃO DA LITERATURA 24
2.1 CANA-DE-AÇÚCAR 24
2.1.1 Importância econômica 24
2.2 SALINIDADE 25
2.2.1 Efeito da salinidade na fisiologia das plantas 26
2.2.2 Mecanismos moleculares de resposta das plantas à salinidade 29
2.2.3 Seleção de variedades tolerantes à salinidade para o melhoramento vegetal 33
2.3 PROTEÔMICA VEGETAL 34
2.4 PROTEÔMICA VEGETAL x SALINIDADE 37
2.5 HIPÓTESE 38
3 OBJETIVOS 39
3.1 OBJETIVO GERAL 39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 39
4 MATERIAL E MÉTODOS 40
4.1 ANÁLISES FISIOLÓGICAS 43
4.1.1 Danos na membrana (vazamento de eletrólitos) 43
4.1.2 Potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}) 44
4.1.3. Teor relativo de água 44
4.1.4 Fotossíntese, transpiração e condutância estomática 44
4.1.5 Análise estatística 45
4.2 ANÁLISE PROTEÔMICA 45
4.2.1 Extração de proteínas 46
4.2.2 Quantificação e integridade das proteínas 47
4.2.3 Eletroforese bidimensional 47
4.2.3.1 Focalização isoelétrica (IEF) 47
4.2.3.2 Gel de poliacrilamida 2D PAGE 48
4.2.3.3 Coloração dos géis 48
4.2.4 Imagens e análise dos géis 49
4.2.4.1 Aquisição das imagens 49
4.2.4.2 Análise dos géis e seleção dos *spots* diferencialmente expressos 49
4.2.5 Digestão 53
4.2.6 Espectrometria de massas 53
4.3 VALIDAÇÕES EXPERIMENTAIS 54
4.3.1 Validação transcricional (RT-qPCR) 54
4.3.1.1 Desenho de iniciadores para validação transcricional (RT-qPCR) 54
4.3.2 Validação por bioensaio 55
5 RESULTADOS 56
5.1 ANÁLISES FISIOLÓGICAS 56
5.1.1 Vazamento de eletrólitos (VE) 56
5.1.2 Teor relativo de água (TRA) 57

5.1.3 Potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}) 58
5.1.4 Fotossíntese líquida (A), transpiração foliar (E) e condutância estomática (gs) 58
5.2 ANÁLISE PROTEÔMICA 60
5.2.1 Raiz 60
5.2.1.1 Extração, quantificação e integridade das proteínas 60
5.2.1.2 Gel 2D PAGE 62
5.2.1.3 Análise das imagens 65
5.2.1.4 Identificação e anotação presumível dos peptídeos diferencialmente expressos em condições de salinidade 71
5.2.1.4.2 Peptídeos com razão de variação de %vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05 78
RB867515 (Tolerante) 78
RB855536 (Sensível) 83
RB867515 x RB855536 88
5.3 VALIDAÇÕES EXPERIMENTAIS 89
5.3.1 Validação por bioensaio 89
5.3.1.1 Superóxido dismutase (SOD) 89
6 DISCUSSÃO 91
7 CONCLUSÕES 107
8 REFERÊNCIAS 108
9 ANEXOS 123
9.1 ANEXO A 123
9.1.2 Análise proteômica de folha de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante à salinidade) e RB855536 (sensível à salinidade) sob estresse por 200 mm de nacl cultivadas em casa de vegetação. 123
9.1.2.1 Extração, quantificação e integridade das proteínas 123
9.1.2.2 Gel 2D PAGE 125
9.1.2.3 Análise das imagens 128
9.2 ANEXO B 134
9.2.1 Validação transcricional (RT-qPCR) 134
9.2.1.1 Desenho de iniciadores para validação transcricional (RT-qPCR) 134
10 MEMORIAL 138

1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar no Brasil é destaque para o cenário mundial em termos de exportação de seus principais produtos: o açúcar e o etanol. No entanto, para que se obtenha um desenvolvimento ideal de cultivo é necessário que haja um sincronismo entre a tecnologia aplicada e as condições edafoclimáticas favoráveis para aumento da produtividade.

Um dos fatores que acarretam redução no crescimento, desenvolvimento e produtividade das culturas é a salinidade dos solos. A cana-de-açúcar é considerada moderamente sensível à salinidade. No entanto, algumas variedades podem se destacar como tolerantes ao excesso de íons na solução do solo, por realizarem mecanismos bioquímicos e fisiológicos de tolerância ao estresse. Antecedendo a esses mecanismos, as plantas captam sinais e ativam vias de transdução de sinais para que ocorram alterações dentro da célula em nível gênico, transcricional e de proteínas que resultarão em mudanças nas vias metabólicas e nos processos fisiológicos, conferindo-lhe tolerância.

Como as proteínas são efetores diretos da resposta ao estresse e por estarem mais próximas da resposta fenotípica, é justificada a importância do estudo proteômico de plantas submetidas a estresse por altas concentrações salinas. A análise proteômica permite o estudo em larga escala da expressão gênica no nível traducional. Apesar de vários estudos sobre respostas diferenciais das plantas ao estresse por sal, e até mesmo com destaque para diferenças observadas especificamente em órgãos de contato mais direto com o sal (raiz) ou de ajuste metabólico posterior, em cana-de-açúcar tais abordagens ainda são restritas.

A análise proteômica nesse contexto permite encontrar proteínas e peptídeos que poderão servir como marcadores moleculares funcionais em cana-de-açúcar, auxiliando no melhoramento genético para maior tolerância à salinidade. Em adição, pode complementar o entendimento das redes de regulação da expressão gênica, contribuindo para ampliar o potencial das variedades já cultivadas ou o desenvolvimento de novas variedades, a partir da identificação de proteínas e genes codificantes envolvidos nos mecanismos responsáveis pelas diferentes respostas fisiológicas ao estresse salino.

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho Identificar peptídeos produzidos diferencialmente em plantas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse salino e que estejam potencialmente associados aos mecanismos de resposta associados à tolerância.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CANA-DE-AÇÚCAR

Sabe-se que a cana-de-açúcar não é nativa do Brasil. Apesar deste país ser o maior exportador de açúcar e segundo maior produtor de etanol do mundo, há indícios de que a mesma é originária do sudeste asiático. A espécie *Saccharum officinarum* foi descrita pela primeira vez por Carlos Linneau em 1753 e anos depois foi cruzada com a *S. spontaneum* para obtenção das atuais variedades comerciais de cana-de-açúcar mais resistentes a pragas, doenças, deficiência hídricas e com alto teor de sacarose (CESNIK, 2004; CIB, 2009).

2.1.1 Importância econômica

Desde a época colonial, que a cultura da cana-de-açúcar apresenta grande importância na economia do Brasil. Ainda hoje, com o alto potencial de seus produtos o seu cultivo, continua em alta (CIB, 2009), apresentando um desenvolvimento excelente, resultante do sincronismo entre a tecnologia aplicada no cultivo e as condições climáticas favoráveis (CONAB, 2010).

De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2008), o Brasil chegou a 34,56% da produção mundial dessa cultura sendo o maior produtor de cana-de-açúcar, seguido da índia com 22,35%. Estima-se que a área de cana-de-açúcar colhida destinada à atividade sucroalcooleira, na safra de 2010/2011, envolveu 8.091,5 mil hectares, distribuídos em todos os estados produtores, sendo Pernambuco representado por 4,1%, ou seja, 334.2 mil hectares (CONAB, 2010).

Os dados anteriormente citados refletem na exportação dos principais produtos provenientes da cana-de-açúcar: o açúcar e o etanol. O Conselho de Informações sobre Biotecnologia (CIB, 2009) aponta o Brasil como o maior exportador de açúcar (45% de todo o produto comercializado no mundo). Estima-se que na safra de 2010/2011 foram produzidas 38.667 mil toneladas do produto

(CONAB, 2010). Já em relação ao etanol, o País divide com os EUA o papel de maior produtor mundial, sendo responsável por 70% do etanol produzido no mundo.

A preocupação com a disponibilidade e preço dos combustíveis fósseis, as preocupações com o meio-ambiente e o aquecimento global têm tornado o etanol uma alternativa renovável de combustível para o Brasil e para o mundo. Sendo assim a crescente demanda mundial por biocombustíveis também tem favorecido a expansão do setor canavieiro, exigindo maior produtividade da cultura. A necessidade de aumentar a produtividade do cultivo da cana-de-açúcar no Brasil representa principalmente para os programas de melhoramento genético um grande desafio já que para atender a demanda é imprescindível a obtenção de variedades produtivas e adaptadas aos diversos problemas ambientais encontrados no país (WACLAWOVSKY et al., 2010).

Dentre os maiores problemas que afetam negativamente a produtividade da cana-de-açúcar, sobretudo no seu crescimento e desenvolvimento em áreas cultivadas, estão a seca e a salinidade dos solos, além de alterações de temperaturas, alta radiação ultravioleta, inundação e diversos poluentes (LAWLOR, 2002). Portanto, pesquisas que visam obter melhorias nas variedades comerciais de cana-de-açúcar relacionadas a esses fatores abióticos são de grande relevância para o papel econômico, social e ambiental desta cultura em nível nacional e mundial.

2.2 SALINIDADE

As plantas, em seu ambiente natural, estão expostas a estresses ambientais decorrentes, por exemplo, das mudanças de temperatura e umidade relativa do ar, radiação solar, deficiência hídrica ou mineral e salinidade no solo (TAIZ; ZEIGER, 2004). Os estresses ocasionados por essas condições edafoclimáticas são denominados de estresses abióticos.

A salinidade, um dos principais estresses abióticos, é caracterizada por uma condição de excesso de íons na solução do solo, que se dá pelo acúmulo predominantemente de íons como o Na^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}, HCO_3^{-}, CO_3^{2-},

BO_3^- e NO_3^- (EPSTEIN; BLOOM, 2006; FERREIRA; SILVA; RUIZ, 2010), prejudicando significativamente a produtividade das plantas cultivadas (MUNNS; TESTER, 2008). É medida através da condutividade elétrica (CE), o parâmetro mais aplicado para expressar a concentração de sais solúveis na água (HOLANDA et al., 2010) .

A CE é expressa em $dS.m^{-1}$, e um solo é definido como salino quando apresenta a CE ≥ 4 $dS.m^{-1}$ e pH < 8,5 (USDA-ARS, 2008; RIBEIRO, 2010a). A salinidade dos solos pode ser de origem natural ou antropogênicas; dentre as antropogênicas, as principais causas são o uso da água de irrigação salinizada acompanhado de uma deficiência no sistema de drenagem na área agricultável, que acaba por permitir o acúmulo de íons na superfície do solo. Em regiões áridas e semi áridas, onde há baixa pluviosidade e alta evapotranspiração observam-se os solos naturalmente salinizados (RUIZ et al., 2006).

Cerca de 8% do solos agricultáveis estão afetados pela salinidade. Segundo dados da FAO (2008), estima-se que, no Brasil, 20 a 25% das áreas irrigadas apresentam problemas de salinização ou de drenagem insuficiente, e 2,4% do total da área terrestre encontra-se salinizada por causas naturais. Na região Nordeste, que corresponde a 110 milhões de hectares, estima-se que 9,1 milhões de hectares já estão salinizados, o que pode causar redução da capacidade produtiva dos solos, prejuízos sócio-econômicos e respostas diversificadas das plantas cultivadas nesta região.

2.2.1 Efeito da salinidade na fisiologia das plantas

Altas concentrações salinas podem causar efeitos diversificados nas plantas derivados por dois componentes principais: o osmótico, que altera drasticamente o balanço hídrico da planta e, o iônico, proveniente do desequilíbrio dos íons, causando efeitos tóxicos e desbalanceamento nutritivo (ZHU, 2001a; LAUCHLI; GRATTAN, 2007) (**Figura 1**). Além disso, pode ocasionar danos oxidativos secundários através do acúmulo das espécies reativas de oxigênio (ERO) (AZEVEDO NETO; GOMES FILHO; PRISCO, 2008).

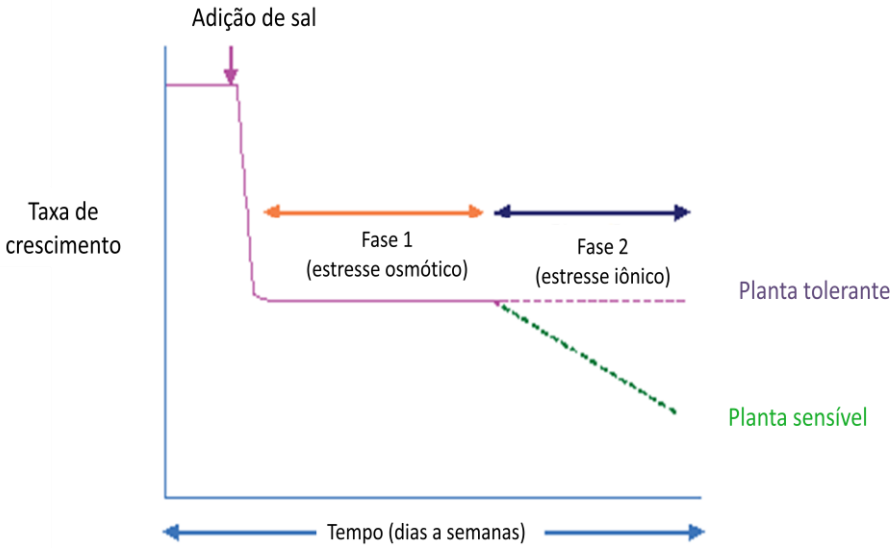


Figura 1. Esquema da resposta de crescimento de plantas superiores em duas fases em resposta à salinidade. Adaptado de Carillo et al. (2011).

Segundo Carillo et al. (2011), plantas sensíveis ou tolerantes à salinidade diferem na taxa em que o sal atinge níveis tóxicos nas folhas. A escala de tempo é de dias, semanas ou meses, dependendo da espécie e do nível de salinidade. Durante a fase 1, o crescimento da parte aérea cai significativamente em ambos os tipos de plantas devido ao efeito osmótico da solução salina, pois a adição do sal em torno das raízes torna mais difícil a absorção de água pela planta. Durante a fase 2, as folhas mais velhas nas plantas sensíveis morrem e reduzem a capacidade fotossintética total, reduzindo seu crescimento. Destaca-se como resposta imediata ao aumento da concentração de sal o fechamento estomático; porém, se os estômatos permanecerem fechados por longo prazo, essa estratégia inviabiliza a continuidade do crescimento da planta.

Em relação aos efeitos osmóticos, a salinidade altera a absorção de água, o equilíbrio iônico e a permeabilidade das membranas, o que em conjunto irá provocar mudanças no metabolismo, no balanço hormonal, nas trocas gasosas e na produção das ERO. Depois, pode haver comprometimento da divisão celular, do crescimento vegetativo e reprodutivo, manifestando-se através de uma inibição rápida da taxa de expansão de folhas jovens, redução da condutância estomática e da fotossíntese, o que acaba por acelerar a senescência das folhas e resultando na morte da planta

sensível (SHANNON; GRIEVE, 1999; NAVARRO et al. 2003; ZHU, 2003; CANABERO; MARTINEZ; CARVAJAL, 2004; PRISCO; GOMES FILHO, 2010).

A integridade das membranas celulares, as atividades de várias enzimas, a aquisição de nutrientes e a função do aparelho fotossintético são primariamente alterados pelos efeitos tóxicos da salinidade elevada, pois, acumulando-se no citoplasma, os íons em concentração tóxica podem desidratar a célula, inibir as enzimas que estão envolvidas diretamente no metabolismo de compostos orgânicos ou podem acumular-se nos cloroplastos e exercer um efeito tóxico direto sobre os processos fotossintéticos (ZHU, 2001b; MUNNS; TESTER, 2008).

No entanto, deve-se salientar que todos os efeitos descritos acima causados pela salinidade irão depender da concentração e da composição iônica da solução, do tipo de solo, do órgão vegetal exposto ao estresse, do modo da indução ao estresse, da duração da exposição à salinidade e da interação com outros tipos de estresses. Além disso, as características vegetais também são importantes, pois os efeitos variam com a espécie, com o genótipo e até mesmo com o estádio de desenvolvimento em que a planta foi submetida ao estresse (BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNYK, 2000).

Vários trabalhos na área da bioquímica e fisiologia vegetal (HUSSAIN, 2004; SANTANA, 2006; NOGUEIRA, 2008; ASHRAF et al., 2010; RIBEIRO, 2010b; WILLADINO et al., 2011; GANDONOU et al., 2011) descrevem os efeitos osmóticos e tóxicos causados pelo excesso de sais no solo em diferentes variedades. Nas espécies mais tolerantes à salinidade, em que a taxa de absorção de sal é reduzida, a maioria dos eventos de desenvolvimento e atividades metabólicas pode ser comum às plantas sob estresse hídrico, por isso as mudanças moleculares ou eventos metabólicos, não são tão facilmente atribuídos ao déficit hídrico ou a efeitos específicos da salinidade (MUNNS, 2002). Estão incluídas nessas espécies as plantas que apresentam a capacidade de compartimentalizar os íons eficientemente nos vacúolos e assim evitarem que se acumulem no citosol, em outras organelas ou na parede celular, e as espécies vegetais capazes de acumular solutos compatíveis no citosol, de modo a atingir o balanceamento osmótico e evitar a perda de água (PRISCO; GOMES FILHO, 2010).

2.2.2 Mecanismos moleculares de resposta das plantas à salinidade

As plantas submetidas a estresse por salinidade percebem e respondem a esta condição através de alteração da expressão gênica, resultando em alterações fisiológicas e bioquímicas. Para que os estudos moleculares sejam completos, é imprescindível que haja entendimento dos mecanismos de regulação que as plantas realizam para tolerar a condição adversa à qual estão submetidas. As plantas primeiramente percebem os estímulos e respondem a eles através de transdução de sinais para o núcleo da célula, o que permite a ativação de vários mecanismos de resposta à salinidade (BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNYK, 2000). As respostas em nível gênico/transcricional podem levar aos mecanismos de homeostase iônica e osmótica, regulação de crescimento e de reparo de danos celulares em plantas sob estresse salino (ZHU et al., 2002).

Podem ser ativados múltiplos caminhos de transdução de sinais em nível celular para a regulação da expressão gênica em plantas sob salinidade, porém ligar esses caminhos às respostas adaptativas é um dos passos críticos na determinação da sobrevivência e reprodução de plantas expostas a ambientes adversos (CHINNUSAMY et al., 2004; SAIRAM, 2004). A resposta da planta ao estresse abiótico envolve muitos genes e mecanismos moleculares e/ou bioquímicos complexos. Segundo Ciarmiello et al. (2011), os efetores que modulam diretamente ou atenuam os efeitos do estresse são classificados como determinantes de tolerância e entre esses estão envolvidos os que atuam como moléculas regulatórias na percepção de estresse, transdução de sinal e na modulação da função efetora.

Estudos na área da genômica funcional focados em análise de expressão gênica em plantas expostas à alta salinidade permitiram a distribuição de genes responsivos em duas classes: inicial e tardia. Na classe inicial estão incluídos os genes que são induzidos rapidamente (em minutos, horas), e de forma transitória; já os pertencentes à classe tardia são ativados de forma mais lenta e sua expressão é sustentada por maior período para a maioria dos genes (SAIRAM; TYAGI, 2004; CIARMIELLO et al., 2011).

Segundo Parida e Das (2005), os genes responsivos ao estresse salino ainda podem ser classificados em diferentes grupos funcionais de acordo com a

codificação de proteínas responsivas à salinidade, tais como: genes codificadores de enzimas que participam da fotossíntese; genes codificadores de solutos compatíveis; genes codificadores de enzimas envolvidas no sequestro de íons para o vacúolo; genes codificadores de enzimas antioxidantes.

O excesso de íons na solução do solo perturba a absorção de água pela planta e a biossíntese de ácido abscísico (ABA) nas folhas, levando a respostas rápidas na condutância estomática. Isso pode afetar negativamente as enzimas que participam do transporte fotossintético de elétrons e da fixação de carbono. Zhang e colaboradores (2011) verificaram que essas mudanças fisiológicas podem estar relacionadas com genes que codificam as proteínas de ligação às clorofilas *a* e *b,* à ribulose-1,5 bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) e à RuBisCO ativase (RCA), as quais foram envolvidas em resultados de tolerância ao estresse salino.

Em geral, genes que codificam proteínas que participam da fotossíntese e do metabolismo de carboidratos apresentam sua expressão reduzida em plantas sob salinidade. Em estudo com tomate sob salinidade, a transcrição de 71 genes que estavam fortemente relacionados com o metabolismo de carboidratos e na fotossíntese foi diminuída, levando à inibição da fotossíntese causada pela salinidade (BERITOGNOLO et al., 2011).

As plantas absorvem água dos solos salinizados devido a ajustes osmóticos intracelulares. Para isso, as plantas acumulam solutos compatíveis que podem ter função protetora e de ajustamento osmótico, assim chamados por serem solúveis e não interferirem com o metabolismo citoplasmático, mesmo em altas concentrações (MUNNS, 2005). Destacam-se, entre esses, o aminoácido prolina, compostos amônio-quaternários como a glicina betaína, β-alanina betaína, prolina betaína, colina-*O*-sulfato, polióis (como pinitol e manitol), açúcares solúveis (como a frutose, sacarose, trealose, rafinose), e as poliaminas (como a putrescina, espermidina e espermina) (BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNYK, 2000; HASEGAWA, 2000; WILLADINO, 2005).

Plantas de cana-de-açúcar foram transformadas com o gene *P5CS*, que codifica a enzima 11-pirrolina-5-carboxilato sintetase, limitante na biossíntese de prolina, em ambiente salino (GUERZONI, 2010). O referido gene foi altamente correlacionado com tolerância à salinidade, pois plantas com 25% a mais de prolina,

apresentaram menor acúmulo de Na^+ nas folhas, proteção do aparelho fotossintético e capacidade de evitar danos oxidativos, permitindo um melhor desenvolvimento.

As proteínas de transporte, H^+-ATPases, além de apresentarem expressão tecido específica também são diferencialmente expressas de acordo com fatores abióticos. Estudos indicam que genes das H^+-ATPases podem ser ativados por várias condições abióticas adversas, que geralmente requerem maior atividade de transporte de íons (JANICKA-RUSSAK, 2011). O gene *AtNHX1*, que codifica a proteína NHX1 em *Arabidopsis*, foi o primeiro a ser relacionado com tolerância a salinidade (HE et al., 2005). A NHX1 é considerada uma proteína, transportadora de Na^+/H^+ encontrada nos vacúolos, que atenua os efeitos de toxicidade iônica causada pelo estresse salino. Aumento de expressão dessa proteína conferiu tolerância em *Arabidopsis thaliana* (APSE et al., 1999) e algodão (HE et al., 2005).

Quando há excesso de NaCl fora das células, o Na^+ entra de forma passiva pelos canais não seletivos e com baixa afinidade, o transportador de sódio HKT1 (SAHU; SHAW, 2009). Como a tolerância à salinidade é uma característica complexa, que pode envolver alterações a nível de células, órgãos ou planta inteira é essencial, na fase de ajuste osmótico, o controle da homeostase de íons intracelular. A atividade das H + ATPase foi relacionado com tolerância à salinidade após observação com plantas halófitas ou em cultivares tolerantes ao estresse salino que apresentaram atividades da enzima bem maiores quando comparadas as plantas sem contato com o sal.

Na última década, pesquisas sobre a via de super-sensibilidade a sais (SOS) vêm sendo priorizadas, pois essa via tem elucidado etapas cruciais na sinalização em resposta ao estresse salino (ROWLEY; MOCKLER, 2011). Um sinal transitório de Ca^{2+}, considerado um importante mensageiro secundário para muitos processos celulares, é o primeiro passo no restabelecimento da homeostase celular. O processo envolve a detecção do íon Ca^{2+} pela proteína SOS3, seguida de interação com SOS2, uma proteína serina/treonina quinase resultando em sua ativação. Essas trabalham em conjunto para fosforilar e ativar a proteína transportadora de Na^+/H^+ encontrada na membrana plasmática (SOS1) que tem por função remover o excesso de sódio no citosol prejudicial para o crescimento e desenvolvimento da planta.

Uma consequência da exposição das plantas ao estresse salino é a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e acúmulo de radicais livres, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-) e radicais hidroxilas (OH^-), que perturbam a homeostase celular redox levando a lesões oxidativas em proteínas, DNA e lipídios (APEL; HIRT 2004; BARTELS; SUNKAR, 2005). Para proteção das organelas e das membranas celulares dos efeitos danosos de concentrações tóxicas das ERO, as plantas realizam dois mecanismos de defesa: um enzimático, que compreende a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase, catalase, glutationa redutase, tioredoxina redutase, polifenoloxidase e peroxidase; e um não enzimático, composto por moléculas antioxidantes, como ácido ascórbico, glutationa reduzida, alcaloides, carotenoides, compostos fenólicos e tocoferol (MITTLER et al*.,* 2004; REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004; PANG; WANG, 2008). Poliaminas e flavonoides também podem proteger as plantas das injúrias do acúmulo de radicais livres ocasionados por estresses ambientais (BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNYK, 2000).

Os mecanismos de defesa consistem em remover ou neutralizar as ERO e podem ser encontrados no apoplasto, citosol, cloroplasto, mitocôndria e peroxissomo (NOCTOR et al., 2004). Em vários estudos, foram encontradas diferenças no nível de expressão ou atividade dessas enzimas antioxidantes, inclusive em cana-de-açúcar (MEDEIROS, 2010; RIBEIRO, 2010b; WILLADINO et al., 2011). A diferença nas respostas contra os danos oxidativos está muitas vezes mais associada ao genótipo tolerante e às vezes com o genótipo mais sensível. Sugere-se que a diferença na atividade antioxidante entre os genótipos pode ser devida a respostas, por exemplo, nos graus de fechamento dos estômatos, em outras respostas que alteram a taxa de fixação de CO_2 ou em processos que evitem a fotoinibição (MUNNS; TESTER, 2008).

A análise das funções de genes induzidas por estresse é uma ferramenta importante não só para compreender os mecanismos moleculares de tolerância ao estresse e as respostas de plantas superiores, mas também para melhorar a tolerância ao estresse das culturas por manipulação genética.

2.2.3 Seleção de variedades tolerantes à salinidade para o melhoramento vegetal

Para seleção de variedades tolerantes à salinidade para uso no melhoramento genético, são necessários conhecimentos prévios de morfologia e fisiologia das plantas a serem estudadas. Primeiramente, as condições edafoclimáticas de como as plantas serão cultivadas devem ser as mesmas para espécies diferentes ou genótipos da mesma espécie. Além disso, sempre tem que ser comparada com uma espécie/genótipo suscetível à salinidade para que possam ser observadas diferenças nos mecanismos de respostas das plantas (FAGERIA; SOARES FILHO; GHEYI, 2010).

Em uma análise imediata da exposição da planta ao estresse, parâmetros como fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar podem ser igualmente importantes a parâmetros morfológicos e fisiológicos de crescimento, concentração de Na/K e acúmulo de solutos compatíveis para indicar tolerância à salinidade dos solos, já que são os primeiros a serem reduzidos (PARIDA; DAS 2005). Porém estudos das alterações a nível fisiológico e morfológico não são suficientes para a obtenção de variedades mais tolerantes aos estresses ambientais, seria necessário uma integralização das respostas das plantas para uma abordagem mais completa.

Combinados a estudos fisiológicos, são conduzidos experimentos que permitam elucidar como são coordenadas as vias bioquímicas e processos celulares que regulam a expressão gênica, principamente aqueles que analisam componentes dos perfis de transcrição, tradução e metabolismo, e que permitam a identificação das funções gênicas envolvidas na tolerância ao estresse salino. Esses estudos devem estabelecer as bases para beneficiar a modelagem de redes regulatórias e ligações entre os produtos dos genes, a bioquímica e a fisiologia da espécie vegetal (YIN; STRUIK, 2010).

A Genética Molecular tem abordado as funções de genes e de seus produtos que estão envolvidos na regulação de sua atividade, assim como na transdução de sinais associados à tolerância aos estresses. A Genômica é um de seus componentes que oferece o conhecimento necessário de sequências gênicas e

permite predições do potencial codificante e funcional de um genoma. No entanto, para conectar as diferentes etapas na distância entre genótipo e o fenótipo mensurável é necessária uma abordagem integrada da Biologia Molecular à Fisiologia da produção, incluindo características agronômicas. Na era pós-genômica, as análises abrangentes utilizando as tecnologias da genômica funcional como transcriptômica, proteômica e metabolômica, aumentaram a compreensão das complexas redes reguladoras associadas com a adaptação e tolerância aos estresses (URANO et al., 2010, YIN; STRUIK, 2010). Dentre as tecnologias complementares que podem auxiliar no melhoramento genético para obtenção de variedades tolerantes à salinidade está a Proteômica, cuja principal vantagem é refletir a expressão gênica em nível traducional e pós-traducional, portanto, mais próxima do fenótipo observado e com maior potencial para explicar possíveis vias de mecanismos de respostas das plantas ao estresse salino.

2.3 PROTEÔMICA VEGETAL

Dentre as várias abordagens utilizadas para se estudar a expressão diferencial de genes associados a respostas a condições adversas está a análise proteômica. Esses estudos permitem uma abordagem mais completa por estar mais próximo à resposta fenotípica. Além disso, assim como a transcriptômica, a proteômica também permite uma análise aberta em larga escala, das proteínas de uma célula, tecido ou órgão (PANDEY; MANN, 2000). Através do sequenciamento completo do genoma de plantas modelo como *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) e arroz (*Oryza sativa*) e do desenvolvimento de métodos analíticos para a identificação e caracterização das proteínas, a proteômica tornou-se um importante campo da genômica funcional (PARK, 2004).

Em cana-de-açúcar, abordagens de genômica funcional vêm sendo intensificadas, pois o banco de dados SUCEST-FUN (http://sucest-fun.org), que contém aproximadamente 238.000 ESTs de 26 bibliotecas de cDNA (VETTORE et al. 2003), tem sido desenvolvido para estudos de expressão gênica através de ferramentas disponíveis que permitem uma abordagem de biologia de sistemas na cana-de-açúcar. Diversos estudos na área da genômica funcional de cana-de-açúcar

visaram elucidar os mecanismos de tolerância aos principais estresses bióticos e abióticos encontrados mundialmente (MENOSSI et al., 2008). A maioria consiste em análise transcriptômica, principalmente relacionada ao conteúdo de sacarose abrangendo diversas técnicas como ESTs, microarranjos e SAGE (VETTORE et al., 2003; PAPINI-TERZI et al., 2005; CALSA Jr.; FIGUEIRA 2007; ROCHA, F. et al., 2007; WACLAWOVSKY et al., 2010; ISKANDAR et al., 2011), identificando assim, genes envolvidos na sinalização celular, resistência a pragas, metabolismo, desenvolvimento e resposta a estresses bióticos e abióticos.

Os primeiros estudos proteômicos em cana-de-açúcar foram realizados para estabelecimento de protocolo de extração de proteínas (LIRA, 2009; RIBEIRO, 2009; 2010c; AMALRAJ et al., 2010), que é uma etapa crucial para garantir a análise do proteoma diferencial até o fim. É importante salientar que os métodos de extração de proteínas diferem para espécies distintas e até mesmo órgãos da mesma planta, ou seja, o protocolo ideal vai depender do tipo de amostra, sua composição química e *status* fisiológico (GÖRG et al., 2004).

Outro método essencial para a análise proteômica é a quantificação das proteínas totais que se conseguiu extrair através do protocolo de extração utilizado. O método de quantificação de proteínas mais utilizado para plantas é o descrito por Bradford (1976), pois permite uma maior determinação de proteínas pelo método de ligação ao corante *Coomassie* Brilliant Blue G-250, elimina a maioria dos problemas envolvidos na extração e, além disso, é muito rápido permitindo o processamento de um grande número de amostras por dia.

O passo seguinte é exatamente no que consiste a análise proteômica, que é a análise das proteínas por eletroforese bidimensional e sua identificação via espectrometria de massas (MS), sendo as principais técnicas utilizadas para análise de proteomas diferenciais (ROCHA et al., 2005). Juntamente com programas computacionais e acessos a bancos de dados públicos essa técnica permite melhor anotação e caracterização das proteínas. A técnica da eletroforese bidimensional consiste na separação das proteínas pelo seu ponto isoelétrico (pI) na primeira dimensão, ou focalização isoelétrica, e em seguida por massa molecular (MM) na segunda dimensão. A eletroforese bidimensional é realizada em gel de poliacrilamida e as proteínas depois de separadas por pI e MM aparecem nesse gel

na forma de “pontos” ou “manchas”, as quais são denominadas - *spots.* Essa técnica se torna ainda mais completa por permitir a identificação de modificações pós-traducionais e diferentes isoformas da proteína, o que seria impossível através apenas da análise transcriptômica daquele mesmo tecido ou órgão em estudo (BAGINSKY; GRUISSEM, 2006; WEISS; GÖRG, 2007).

Entretanto, algumas dificuldades são encontradas nas etapas da análise proteômica como, por exemplo, a reprodutibilidade dos géis, detecção das proteínas que aparecem em pequena quantidade, como as proteínas de membrana e fatores de transcrição, resolução dos *spots* inadequada para análise além, das proteínas hidrofóbicas que apresentam resolução bem menor que as hidrossolúveis (ANDRADE et al., 2006). Atualmente, pesquisadores da área têm se preocupado em reduzir esses efeitos e produzir resultados mais precisos, confiáveis e melhores para serem analisados por meio de programas computacionais, principalmente para selecionar os *spots* de amostras contrastantes, visto que a proteômica é mais utilizada em termos de comparação.

A espectrometria de massas no contexto da análise proteômica é ainda uma tecnologia indispensável para interpretação da informação codificada do genoma. Até o momento, análises de proteínas, como sequência primária, modificações pós-traducionais ou interações proteína-proteína pelo espectrômetro de massas (MS) têm sido bem sucedidas quando aplicados a pequenos conjuntos de proteínas isolados em determinados contextos funcionais, principalmente em condições adversas (AEBERSOLD; MANN, 2003).

Em plantas, por exemplo, estudos proteômicos têm sido relacionados na maioria das vezes, com estresses bióticos e abióticos. Existem inúmeros trabalhos envolvendo estresses por baixa temperatura (RINALDUCCI et al., 2011), alta temperatura (AHSAN et al., 2010), seca (ALI; KOMATSU, 2006; JORGE et al., 2007; CARUSO et al., 2009), alagamento (KOMATSU et al., 2011), irradiação UV-B (CASATI et al. 2005), além de estresses combinados (YANG et al. 2011; ZHANG et al. 2011).

Em folhas e colmos de plantas de cana-de-açúcar já foram identificadas várias proteínas associadas a mecanismos de resposta ao estresse hídrico (RIBEIRO, 2010), entre elas: proteínas associadas à regulação da transcrição

(proteína de ligação ao RNA rica em glicina) e à tradução (fator de enlongação 1 alfa e proteína ribossômica 60S L30); componentes estruturais (histona H2A.2.2); proteínas relacionadas aos componentes do citoesqueleto (fator de despolimerização da actina 3); quinases (nucleosídeo-difosfato quinase I); enzimas envolvidas no metabolismo da glicose (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, citossólica); várias proteínas do choque térmico (HSP70kDa, 17.5kDa classe II, 81-1 e 18.0kDa); e proteínas associadas à fotossíntese (complexo de evolução do oxigênio 1-1; subunidade N do centro de reação do FSI).

Em plantas sob estresse por altas concentrações de NaCl são encontrados estudos de proteômica principalmente com arroz (YAN et al., 2005), *Arabidopsis* (JIANG et al., 2007), trigo (PENG et al., 2009), cevada (SUGIMOTO; TAKEDA, 2009), tabaco (RAZAVIZADEH et al. 2009), milho (ZÖRB et al., 2010), pepino (DU et al., 2010) e tomate (MANAA et al., 2011). Contudo, e apesar da importância da cana-de-açúcar, este tipo de estudo ainda é restrito.

2.4 PROTEÔMICA VEGETAL x SALINIDADE

Na área da proteômica, alguns autores relatam que há uma diminuição na síntese de proteínas em plantas em condições de salinidade, pois a proteólise é aumentada (PARIDA; DAS, 2005; SILVEIRA et al., 2005). Porém a síntese de outras proteínas como as envolvidas principalmente na estabilização das membranas celulares e na sinalização de respostas ao estresse salino pode ser aumentada (TESTER; DAVENPORT, 2003). Atualmente, existe um banco de dados de proteínas responsivas ao sal, provenientes de estudos proteômicos, com um total de 2.170 proteínas observadas em folhas, raízes, brotos, mudas, grãos, hipocótilo, radícula, e panículas de 34 espécies de plantas (ZHANG et al., 2011). A maioria das proteínas responsivas ao excesso de íons está envolvida na fotossíntese, metabolismo energético, limpeza das EROs e homeostase de íons.

Segundo Kosová (2011), as enzimas envolvidas na glicólise e no metabolismo de carboidratos apresentam maior acúmulo em plantas glicófitas, como a cana-de-açúcar, em meio salino indicando a necessidade de regulação dessas vias para aumento da produção de energia. Além disso, as proteínas envolvidas em

importantes processos fisiológicos, tais como estabilização de membranas, homeostase iônica e transdução de sinais são observadas com aumento de acúmulo através de regulações nessas vias.

A maioria das enzimas relacionadas com fixação de CO_2 mostrou diversas mudanças em diferentes espécies de plantas sob estresse salino, o que permite dizer que a maquinaria de fotossíntese e a fixação de CO_2 é sensível ao estresse por excesso de íons no meio em que a planta se desenvolve (ZHANG et al., 2011).

No maior grupo observado, certamente, estão as enzimas envolvidas com a eliminação das EROs, indicando que esse sistema deve ser ativado para aliviar os danos ocasionados pelo estresse oxidativo. A maioria dessas enzimas apresentou expressão induzida em 24 espécies de plantas (KOSOVÁ et al., 2011, ZHANG et al., 2011). Porém, outras plantas podem ativar a via não enzimática de proteção aos danos oxidativos, como o acúmulo da enzima glutamina sintetase essencial para a síntese de prolina, que pode atuar tanto como protetora de danos oxidativos quanto osmólito compatível para restabelecimento da homeostase iônica.

Portanto, é de suma importância relacionar as proteínas diferencialmente expressas encontradas em condições adversas com a tolerância ou suscetibilidade ao sal em plantas, visto que as mesmas não possuem padrões de expressão específicos para essa condição, além de variar ainda entre genótipos da mesma espécie.

2.5 HIPÓTESE

A elucidação da regulação da expressão gênica em cana-de-açúcar ligada à salinidade através da investigação do proteoma (em especial dos peptídeos diferenciais) através de 2D-PAGE e espectrometria de massas, permitirá identificar peptídeos e os respectivos genes codificantes alterados pelo estresse salino, viabilizando um significativo avanço na determinação dos mecanismos de regulação e das interações entre as redes de genes nesta espécie cultivada.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar peptídeos produzidos diferencialmente em plantas de cana-de-açúcar submetidas a estresse salino, potencialmente associado aos mecanismos de resposta a esse desafio.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Apontar dentre as variedades de cana-de-açúcar estudadas as que apresentaram respostas associadas à tolerância e/ou à suscetibilidade à salinidade conforme parâmetros fisiológicos.

b) Selecionar peptídeos produzidos diferencialmente em resposta ao estresse salino em raízes de cana-de-açúcar.

c) Identificar as proteínas selecionadas e relacioná-las via anotação presumível com possíveis mecanismos de tolerância ao estresse por salinidade.

d) Selecionar proteínas candidatas para o uso no melhoramento genético, visando maior tolerância da cana-de-açúcar à salinidade dos solos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, no período de março a maio de 2010. Foram avaliadas as variedades RB92579, RB867515 (tolerantes à seca) e RB72454, RB855536 (sensíveis à seca) (**Tabela 1**), gentilmente cedidas pela RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro), procedentes do Campus Avançado da UFRPE - Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina (EECAC/UFRPE), localizada no município de Carpina, Zona da Mata Norte de Pernambuco.

Tabela 1. Características das variedades pré-selecionadas de cana-de-açúcar de acordo com a tolerância à seca, exigência em ambiente, teor de sacarose e teor de fibras.

Variedades de cana-de-açúcar	Exigência em ambientes	Tolerância à seca	Teor de sacarose	Teor de fibra
RB867515	Média restrição	Tolerante	Alto	Médio
RB92579	Média restrição	Tolerante (soca)	Alto	Médio
RB72454	Sem restrição	Sensível	Alto	Médio
RB855536	Alta restrição	Sensível	Alto	Baixo

Fonte: RIDESA, 2010

As plantas utilizadas foram propagadas através de fragmentos de secção transversal do colmo, com média de 50 mm de comprimento (40 mm - 61 mm) e 24 mm de diâmetro (19 mm – 27 mm), contendo uma gema lateral. Os mesmos foram plantados em bandejas de polietileno contendo 9 kg de areia previamente lavada como substrato. Quinze dias após a brotação, as plantas mais uniformes quanto à altura, com aproximadamente 84 mm, foram transplantadas para vasos de polietileno, três plantas por vaso, com 12 kg de areia previamente lavada para a retirada da matéria orgânica, sendo regada em dias alternados com água de torneira e com solução nutritiva a ½ força de Hoagland e Arnon (1950) até a drenagem da rega (**Figura 2**).

Figura 2. Imagens do experimento de cana-de-açúcar sob condições de salinidade em casa de vegetação. A) Propagação por fragmentos de secção transversal em bandejas. B) Plantas com 15 dias após a propagação. C) Transplantio das plantas para vasos de polietileno. D) Visão geral do experimento.

As plantas foram mantidas nessa condição por 45 dias e, após esse período, foram expostas ao estresse salino. Em média, as mudas já estavam com sete folhas, 229 mm de altura e 7 mm de diâmetro de colmo. Os tratamentos empregados foram: controle (solução nutritiva a ½ força) e salino (solução nutritiva a ½ força contendo 200 mM de NaCl). Essa condição salina foi escolhida para causar estresse osmótico intenso na fase inicial de exposição ao estresse, a fim de alcançar resultados instantâneos de percepção ao estresse por sal. Os tratamentos corresponderam a 1,0 e 16,88 $dS.m^{-1}$ de condutividade elétrica (CE) da solução estoque a ser utilizada para indução ao estresse salino, para o tratamento controle e estresse com NaCl, respectivamente. Os níveis de salinidade da solução estoque foram medidos em condutivímetro (Waterproof), através de leituras em $dS\ m^{-1}$, o mesmo aparelho foi

utilizado para manter os referidos níveis de salinidade no substrato após a drenagem da solução dos vasos no momento da indução ao estresse salino.

A condutividade elétrica da solução no substrato para cada tratamento, mensurada após drenagem total da aplicação da solução com 200 mM de NaCl variou de 15,41 – 15,70 dS m^{-1} para as plantas após 2 h e de 16,69 – 17,07 dS m^{-1} para as plantas após 72 h de estresse. As CE da solução onde estavam às plantas da condição controle variaram entre 0,87 a 1,62 dS m^{-1}. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 (variedades x tratamento) com três repetições, totalizando 24 parcelas (**Figura 3**).

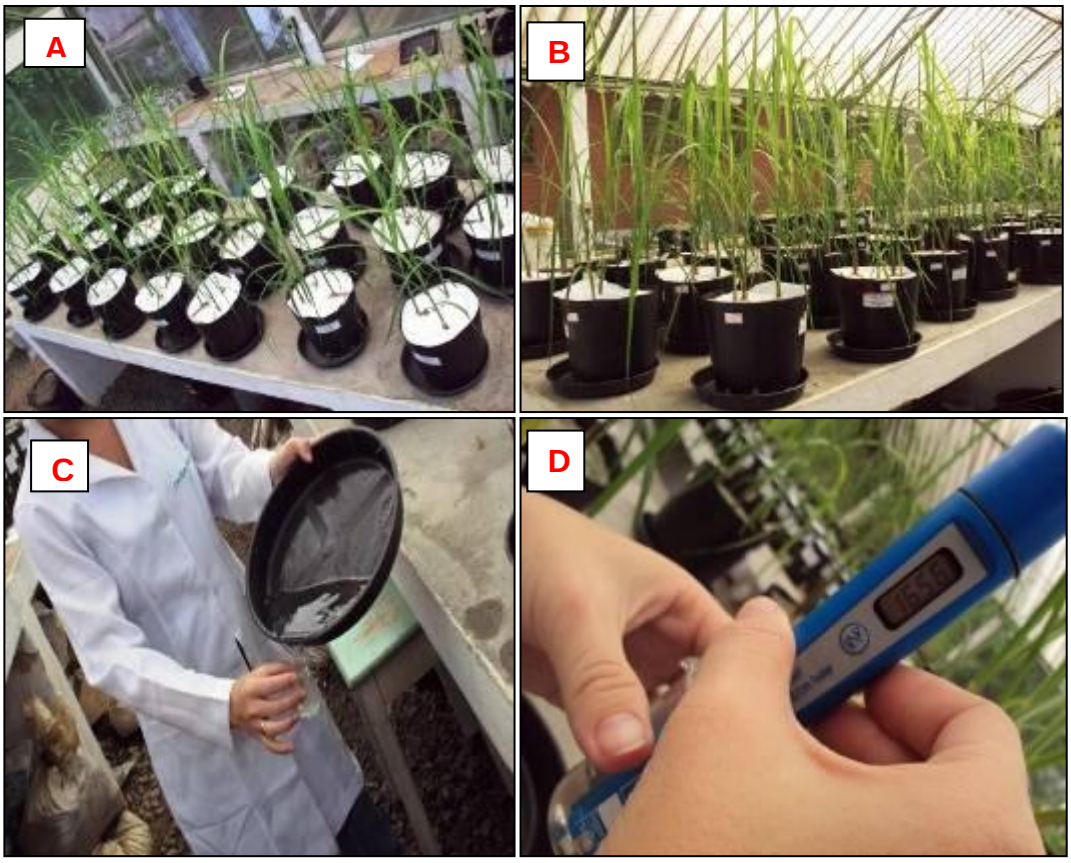


Figura 3. Imagens da diferenciação dos tratamentos salinos no experimento de cana-de-açúcar em casa de vegetação. A e B) Visão geral das plantas no dia da realização da coleta. C e D) Coleta da solução drenada e medição da condutividade elétrica.

As coletas foram realizadas 2 h e 72 h após a aplicação da solução com NaCl, além das correspondentes sem estresse salino (controles) tanto para as análises fisiológicas quanto para a análise proteômica. Esses tempos foram

escolhidos para obter resposta inicial ao estresse (2 h) e a resposta tardia (72 h). No momento das coletas, as condições ambientais no interior da casa de vegetação (temperatura média e umidade relativa do ar média) medidas com termohigrômetro (Microvelle, LR03), foram de 29,6 °C e 81% após 2 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl, e 33,5 °C e 52% após 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl.

Com base nos resultados obtidos nas análises fisiológicas, foram escolhidas duas variedades de cana-de-açúcar: a mais tolerante ao estresse salino, dentre as consideradas tolerantes à seca e, a mais sensível dentre as variedades sensíveis à seca.

4.1 ANÁLISES FISIOLÓGICAS

4.1.1 Danos na membrana (vazamento de eletrólitos)

O grau de integridade das membranas foi estimado pela análise de vazamento de eletrólitos (ALVES et al., 2009, com modificações) após 2 e 72 h após a indução estresse por sal. Foram coletadas 10 amostras da folha +2, com área de 0,5 cm^2 (0,5 cm base x 1,0 cm altura) de cada réplica biológica, essas amostras foram colocadas em tubos de ensaio com 10 mL de água destilada e incubada em banho-Maria a 25 °C por 24 h. Após o período de incubação foi determinada a condutividade elétrica do extrato (C_1) com condutivímetro (PHTEK CD 203), expressa em $\mu S.cm^{-1}$. Em seguida, as mesmas amostras de folhas foram colocadas em banho-Maria a 100 °C por 1 h e, após resfriamento até temperatura ambiente foi realizada a leitura da condutividade elétrica do extrato (C_2). O percentual de vazamento de eletrólitos, proporcional principalmente aos danos na membrana plamática, foi estimado pela seguinte relação: $\%DM = (C_1/C_2) \times 100$.

4.1.2 Potencial hídrico foliar (Ψ_{wf})

Para a determinação do Potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}), foram utilizadas as folhas 0, onde as mesmas foram coletadas com tesoura, rapidamente envoltas com filme plástico e armazenadas em recipiente com gelo. As leituras de Ψ_{wf} foram realizadas através do uso de câmara de pressão (SCHOLANDER et al., 1965).

4.1.3. Teor relativo de água

O teor relativo de água (TRA) foi determinado nas mesmas folhas utilizadas para a determinação do percentual de vazamento de eletrólitos utilizando-se cinco discos de área conhecida da matéria fresca (desprezando-se as nervuras), os quais foram imediatamente pesados para obtenção do peso da massa fresca (PMF). Em seguida, os mesmos foram acondicionados em placas de Petri, com papel filtro, contendo 10 mL de água destilada. As placas foram deixadas em geladeira por um período de 24 h. Após este período, os discos foram novamente pesados para obtenção do peso da massa túrgida (PMT). Finalmente, os discos foram colocados em estufa com circulação forçada de ar a 65 ºC, até atingirem peso constante, obtendo-se assim o peso da massa seca (PMS). O TRA foi calculado conforme a fórmula: TRA={[(PMF – PMS) / (PMT – PMS)] x 100}, conforme Barrs e Weatherley (1962).

4.1.4 Fotossíntese, transpiração e condutância estomática

As medições de fotossíntese líquida (A), transpiração (E) e condutância estomática (gs) foram realizadas com o analisador portátil de CO_2 a infravermelho (IRGA, ADC modelo LCi Pro, Hoddesdon, UK).

4.1.5 Análise estatística

Os dados fisiológicos obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% probabilidade através do programa estatístico Assistat 7.5 Beta.

4.2 ANÁLISE PROTEÔMICA

Para obtenção das amostras para a análise proteômica, foram coletadas as folhas +1 (conforme van Dillewijn e Waltham, 1952) a primeira folha de cima para baixo que apresenta bainha visível, e raízes. As amostras coletadas foram cortadas em frações menores com tesoura, previamente limpa com álcool 70%, colocadas em tubos cônicos de 15 mL e 50 mL (Falcon) para folhas e raízes respectivamente, e foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C (**Figura 4**).

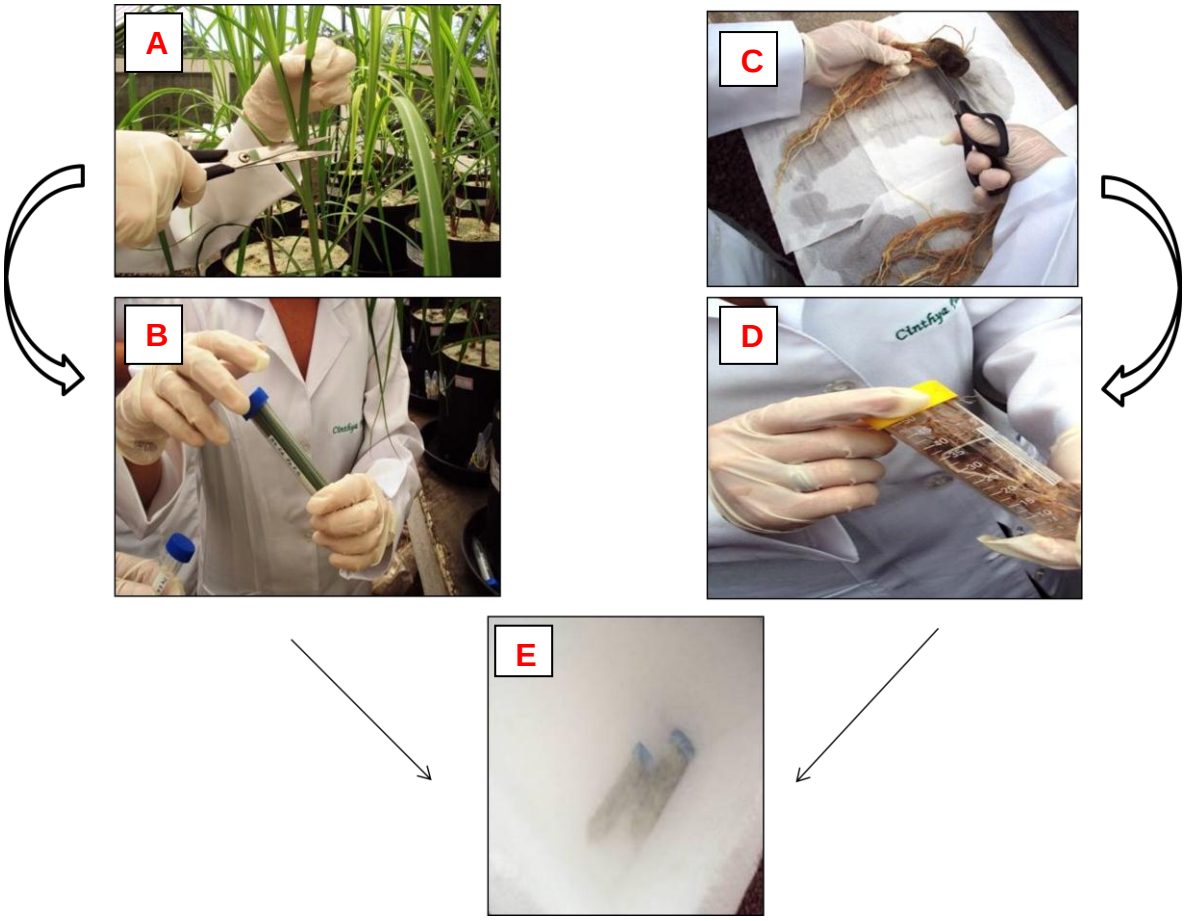


Figura 4. Imagens da coleta de folha e raiz de cana-de-açúcar sob condições de salinidade em casa de vegetação para a análise proteômica. A) e B) Coleta da folha +1. C) e D) Coleta da raiz. E) Material coletado imerso em nitrogênio líquido.

4.2.1 Extração de proteínas

As proteínas totais foram extraídas pelo método que utiliza o fenol como principal reagente de extração (HURKMAN; TANAKA, 1986). As amostras do material vegetal foram maceradas em um cadinho de porcelana com pistilo, em nitrogênio líquido, até a obtenção de pó fino e depois armazenado em tubos de 2 mL. Aproximadamente 1g do material vegetal macerado foram utilizados para extração, que foi realizada através da adição de 500 µL de tampão de extração composto por Tris HCl pH 8,5 (0,1 M), EDTA (10 mM), sacarose (0,9 M), 2-β mercaptoetanol (0,4%) e 500 µL de fenol. As amostras foram agitadas vigorosamente, por 1 min, sem aquecimento, e depois mantidas em agitação

constante por mais 30 min a 4 °C. Após essa etapa foi realizada uma centrifugação a 5.000 *g* por 10 min a 4 °C, onde foi removido o sobrenadante para um novo tubo. Foi feita uma re-extração onde o processo anterior foi repetido, porém sem a etapa da agitação por 30 min e a centrifugação passou a ser por 12.000 *g* por 20 min. As proteínas foram precipitadas através da adição de 5 volumes de acetato de amônio em metanol (0,1 M) gelado e incubados a -20 °C por 24 h. As amostras foram centrifugadas a 15.000 *g* por 20 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e seguiram-se duas lavagens do *pellet* com 1 mL de acetato de amônio em metanol (0,1 M) e acetona a 80% e uma única vez com etanol a 70%, intercaladas com as etapas de incubamento por 30 min a -20 °C e centrifugação (15000 g, 10 min a 4 °C). Após as lavagens, o *pellet* foi seco em temperatura ambiente e as proteínas foram solubilizadas em uma solução de ureia e tioureia (8 M:2 M) e, finalmente incubadas a -20 °C para posterior análise 2D.

4.2.2 Quantificação e integridade das proteínas

As proteínas solúveis totais foram quantificadas através do protocolo de quantificação pelo método de Bradford (1976) que utiliza o Coomassie Brilliant Blue G-250 como reagente de coloração e a albumina de soro bovino (BSA) para estabelecimento da curva padrão. Partiu-se de 20 µL das amotras proteicas, adicionado de água deionizada e o reagente de coloração alcançando um volume final de 2 mL da solução que foi analisada em espectrofotômetro de luz visível (Bioespectro SP-220) a 595 nm. Algumas amostras foram diluídas, apresentando um fator de diluição igual a 2. A integridade das proteínas foi visualizada através da imagem após SDS-PAGE a 12,5%.

4.2.3 Eletroforese bidimensional

4.2.3.1 Focalização isoelétrica (IEF)

A IEF foi realizada com fita IPG de 11 cm e pH de 3-10 para cada uma das três réplicas biológicas. Foram aplicadas 60 µg de proteínas totais das amostras de raiz nas fitas de acrilamida desidratada (IPG 11 cm, gradiente de pH 3-10 não linear; GE Life Sciences) dissolvidas em solução de ureia 7 M, tioureia 2 M, CHAPS 2% (m/v), 19,4 mM de DTT, anfolinas 0,5% (v/v) (IPG buffer, pH 3-10 não linear; GE Life Sciences) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). A etapa de reidratação das fitas foi realizada no dispositivo para focalização isoelétrica (IPGphor, GE Life Sciences) à temperatura ambiente por 16 h. As fitas foram focalizadas em gradiente de pH imobilizado, em três etapas, nas seguintes condições: 300 V – 30 V/h, 3500 V – 2900 V/h, 3500V- 6170 V/h. Durante toda a focalização, foram mantidas condições constantes de corrente (2 mA) e potência (5 W). Após a focalização as fitas foram armazenadas a -20 °C até a realização da segunda dimensão.

4.2.3.2 Gel de poliacrilamida 2D PAGE

Após a focalização as fitas IPG foram equilibradas com solução contendo Tris-HCI 50 mM (pH 8,8), uréia 6 M, glicerol 30% (v/v) e SDS 2% (m/v), em duas etapas: adicionou-se DTT 1% (m/v) e foi submetido a agitação por 20 min; adicionou-se IAA 2,5% (m/v) e foi submetido a agitação por 20 min. A segunda dimensão da eletroforese foi realizada no aparelho Multiphor II Electrophoresis Unit (GE Life Sciences), em gel de poliacrilamida 12,5%, ExcelGel homogêneo (GE Life Sciences) de 24 cm a 15 °C. A primeira etapa da eletroforese ocorreu a 120 V, 20 mA e 30 W , em condições constantes, com duração de aproxidamente 40 min. Esta etapa encerra-se quando a amostra se difunde da fita IPG para o gel. A segunda etapa da corrida foi realizada a 600 V, 50 mA e 30 W, constantes.

4.2.3.3 Coloração dos géis

Após a eletroforese, os géis foram colocados em solução fixadora (etanol 40%, ácido acético 10%) por 30 min, seguido da solução de coloração (corante *azul de Coomassie PhastGel blue R,* GE Life Sciences) 0,02% em metanol, ácido acético

e água deionizada na proporção de 3:1:6, respectivamente, por 1,5 h. O gel foi descorado após quatro lavagens seguidas com solução descorante (etanol 20%, ácido acético 5%) por 15 min, 45 min e duas vezes por 2 h. Após as lavagens os géis foram armazenados em solução de preservação (ácido acético 5%).

4.2.4 Imagens e análise dos géis

4.2.4.1 Aquisição das imagens

Depois de descorados, os géis foram digitalizados no ImageScanner III (GE Life Sciences) com uso do programa LabScan 6.0 (GE Life Sciences). Para a digitalização foram utilizados os seguintes parâmetros: modo de transparência, resolução de 150 dpi e filtro vermelho, ideal para coloração de géis com *azul de Coomassie*. Para a captura da imagem foi realizada previamente uma etapa de calibração do *scanner*, com a fita de calibração Kodak 3, que apresenta valores de densidade ótica ou difusa definidos, conforme procedimentos recomendados pelo fabricante.

4.2.4.2 Análise dos géis e seleção dos *spots* diferencialmente expressos

As análises das imagens dos géis foram realizadas através do programa Image Master 2D Platinum v7.05 (GE Life Sciences). Essas imagens foram processadas no próprio programa onde foram realizados ajustes quanto ao tamanho e redução de interferências de contrastes.

Foram criados projetos nos quais os géis foram agrupados em pastas obedecendo às hierarquias recomendadas pelo programa, dentro das quais foram realizadas as comparações. Foram utilizadas três réplicas biológicas para cada condição salina para realização das análises, onde primeiramente, foi observado o coeficiente de correlação entre as réplicas biológicas para verificar a reprodutibilidade dos géis e, portanto só foi possível realizar a análise se as réplicas

biológicas apresentassem alto coeficiente de correlação. As amostras dos géis foram agrupadas em três séries de três comparações (*matches*) resultando em nove comparações para cada órgão. Em cada série apenas um parâmetro (tratamento ou variedade) foi adotado como variável (**Tabela 2**).

Tabela 2. Comparações (matches) analisadas no programa Image Master 2D Paltinum v7.05 (GE Life Sciences).

Órgão	Variedade	Comparações dos tratamentos (NaCl)
Raiz e Folha	RB867515	0 mM x 200 mM (2 h)
		0 mM x 200 mM (72 h)
		200 mM (2 h) x 200 mM (72 h)
	RB855536	0 mM x 200mM (2 h)
		0 mM x 200mM (72 h)
		200 mM (2 h) x 200 mM (72 h)
	RB867515 x RB855536	0 mM
		200 mM (2 h)
		200 mM (72 h)

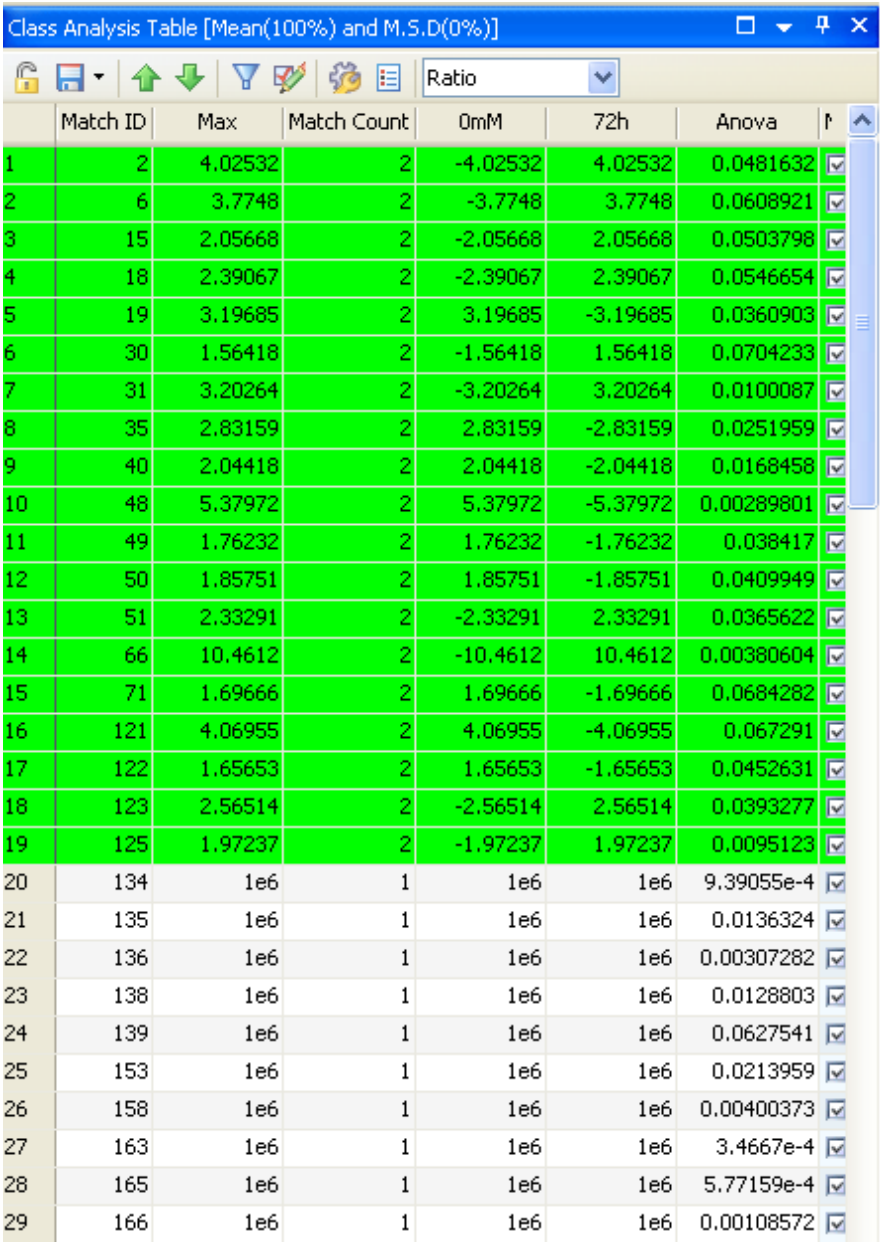
Com base na normalização e nas análises estatísticas realizadas no programa Image Master 2D Platinum v7.05 (GE Life Sciences), foi possível verificar expressão diferenciais de proteínas, assim como *spots* exclusivos entre tratamentos e variedades, que podem estar associados a mecanismos de resposta ao estresse salino, permitindo a escolha destes para posterior digestão e identificação no espectrômetro de massas. Essa análise é apresentada no programa em forma de vários relatórios de análises dos géis e das comparações (*matches*) entre os mesmos. Esses relatórios apresentam informações importantes sobre os *spots*, como sua localização no gel, o ponto isoelétrico (pI), a peso molecular (MW), porcentagem de volume (%), além de informar as comparações (*matches*) (**Figura 5**).

Spot Table

	FileName	SpotID	Match ID	pI	MW	%Vol
1	7515_Controle_3	311	0	8.87578	18336	1.01363
2	7515_Controle_3	293	1	6.2409	12065	0.283251
3	7515_Controle_3	291	2	7.04015	12440	0.339892
4	7515_Controle_3	290	3	6.68005	12440	0.627695
5	7515_Controle_3	289	4	7.77792	12525	0.249796
6	7515_Controle_3	288	-	5.17817	12610	0.145949
7	7515_Controle_3	287	-	5.09912	12525	0.229116
8	7515_Controle_3	286	5	8.17315	12610	0.189785
9	7515_Controle_3	285	6	8.91092	12653	0.12851
10	7515_Controle_3	284	7	4.50188	12783	0.265892
11	7515_Controle_3	283	167	5.59097	12783	0.268121
12	7515_Controle_3	281	8	8.77917	12653	0.454169
13	7515_Controle_3	280	9	5.25721	12870	0.334537
14	7515_Controle_3	279	10	5.18695	13002	0.828344
15	7515_Controle_3	278	11	9.06023	13091	0.349692
16	7515_Controle_3	277	12	5.02886	13091	0.667063
17	7515_Controle_3	276	168	4.87077	13181	0.34575
18	7515_Controle_3	275	13	9.24467	13181	0.270811

Figura 5. Representação da tabela de análises dos géis no programa Image Master 2D Platinum v7.0 (GE Life Sciences) onde *File Name* corresponde ao nome do gel, *Spot* ID é a identificação de cada *spot*, *Match* ID é um número atribuído a cada comparação nos géis contrastantes (*Match*), pI o ponto isoelétrico do *spot*, MW corresponde a massa molecular e %Vol é a porcentagem de volume do *spot* no gel.

Dentre esses parâmetros, a porcentagem de volume (%Vol) tem sido o mais utilizado como padrão na literatura, pois indica um valor normalizado do volume de cada *spot* em relação ao volume do total de *spots* detectados na imagem do gel, digitalizada e calibrada por densidade ótica. O parâmetro mais informativo para esse tipo análise é o que indica a razão de variação da %Vol (*Ratio*), que corresponde à razão entre os dois *spots* correspondentes em um *match* (**Figura 6**).



	Match ID	Max	Match Count	0mM	72h	Anova
1	2	4.02532	2	-4.02532	4.02532	0.0481632
2	6	3.7748	2	-3.7748	3.7748	0.0608921
3	15	2.05668	2	-2.05668	2.05668	0.0503798
4	18	2.39067	2	-2.39067	2.39067	0.0546654
5	19	3.19685	2	3.19685	-3.19685	0.0360903
6	30	1.56418	2	-1.56418	1.56418	0.0704233
7	31	3.20264	2	-3.20264	3.20264	0.0100087
8	35	2.83159	2	2.83159	-2.83159	0.0251959
9	40	2.04418	2	2.04418	-2.04418	0.0168458
10	48	5.37972	2	5.37972	-5.37972	0.00289801
11	49	1.76232	2	1.76232	-1.76232	0.038417
12	50	1.85751	2	1.85751	-1.85751	0.0409949
13	51	2.33291	2	-2.33291	2.33291	0.0365622
14	66	10.4612	2	-10.4612	10.4612	0.00380604
15	71	1.69666	2	1.69666	-1.69666	0.0684282
16	121	4.06955	2	4.06955	-4.06955	0.067291
17	122	1.65653	2	1.65653	-1.65653	0.0452631
18	123	2.56514	2	-2.56514	2.56514	0.0393277
19	125	1.97237	2	-1.97237	1.97237	0.0095123
20	134	1e6	1	1e6	1e6	9.39055e-4
21	135	1e6	1	1e6	1e6	0.0136324
22	136	1e6	1	1e6	1e6	0.00307282
23	138	1e6	1	1e6	1e6	0.0128803
24	139	1e6	1	1e6	1e6	0.0627541
25	153	1e6	1	1e6	1e6	0.0213959
26	158	1e6	1	1e6	1e6	0.00400373
27	163	1e6	1	1e6	1e6	3.4667e-4
28	165	1e6	1	1e6	1e6	5.77159e-4
29	166	1e6	1	1e6	1e6	0.00108572

Figura 6. Representação da tabela de análises de classes no programa Image Master 2D Platinum v7.05 (GE Life Sciences) onde: *Match* ID é um número atribuído a cada *spot* na comparação nos géis contrastantes (*Match*); Ratio corresponde à razão de variação entre a %Vol dos dois *spots* correspondentes em um *match,* indicado na coluna *Max*; o sinal de "-" representa que a proteína é menos expressa nessa condição e o Anova a porcentagem de erro para cada comparação dos *spots* diferencialmente expressos.

Foram selecionados os *spots* que apresentaram valor da razão da %Vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05, o que representa maior confiabilidade estatística. Para *spots* de raiz, também foram considerados os que variaram apenas no valor da % Vol ≥ 1,5.

4.2.5 Digestão

Para digestão dos *spots*, os mesmos foram excisados manualmente dos géis, devidamente identificados por gel e *match* de origem, e estocados a -20 ºC em água deionizada estéril. Primeiramente, os fragmentos de géis foram descorados por incubação em metanol 50%/ácido acético 2,5% por 3 h em temperatura ambiente. Depois de desidratados com acetonitrila 100%, as proteínas sofreram redução com a solução de DTT (Dithiothreitol) a 10 mM e em seguida uma aquilação com IAA (50 mM). O gel foi lavado com bicarbonato de amônio a 100 mM e desidratado com acetonitrila a 100%, esse processo foi repetido mais uma vez. Após essas etapas, foi adicionada a solução com 20 µg de tripsina para digestão da proteína onde ficou incubada em banho de gelo por 30 min. O excesso de tripsina foi removido e foi adicionado a solução de bicarbonato de amônio 50 mM cobrindo o gel incubando por 16 h a 37ºC. No dia seguinte, sem remover a solução anterior, foi acrescentada a solução de extração 1 (ácido fórmico 5%) onde foi incubada por 10 min. A temperatura ambiente, após dado um *spin* rápido o sobrenadante foi transferido pra outro tubo. O mesmo foi feito para a solução de extração 2 (ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%), porém esse foi repetido duas vezes. Finalmente as amostras foram totalmente evaporadas em evaporadores centrífugos tipo *speed-vac* (eppendorf) e armazenadas a -20ºC até a realização das análises via espectrometria de massa.

4.2.6 Espectrometria de massas

O sequenciamento dos peptídeos foi realizada em colaboração com o grupo do Dr. Fábio Gozzo, do Instituto de Química da Universidade de Campinas (IQ-UNICAMP), em espectrômetro do tipo UPLC-ESI-Q-ToF. A seleção dos espectros foi realizada com uso do programa Distler (Matrix Science), e a identificação presumível foi realizada por *figerprinting* no programa Mascot (Matrix Science), contra o banco de dados NCBInr (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). As sequência de aminoácidos obtidas foram comparadas através de BLAST com o banco de dados Uniprot (http://www.uniprot.org/) a fim de, obter mais informações a respeito de proteínas

não identificadas pelo Mascot, bem como certificar a anotação das demais com base em dados atualizados. As proteínas identificadas foram categorizadas por processo biológico e função molecular através do banco de dados Gene Ontology (AmiGO - http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi).

4.3 VALIDAÇÕES EXPERIMENTAIS

4.3.1 Validação transcricional (RT-qPCR)

4.3.1.1 Desenho de iniciadores para validação transcricional (RT-qPCR)

A partir das sequências peptídicas, obtidas via espectrometria de massas (**Tabela 6** e **7**), derivadas das proteínas com variação significativa no nível traducional entre amostras contrastantes para estresse por salinidade, foi determinada a anotação presumível contra o banco de dados transcricionais, TIGR GeneIndex/*Saccharum*(http://compbio.dfci.harvard.edu/cgibin/tgi/gimain.pl?gudb=s_officinarum), específico de cana-de-açúcar. Para cada sequência peptídica foi encontrada a sequência nucleotídica transcrita presumivelmente codificadora (*cluster* ou *singleton*, respectivamente agrupamento de sequências alinhadas ou sequências sem similaridade no banco de dados). Esta foi utilizada para desenho de iniciadores no programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/), com os seguintes parâmetros ajustados: tamanho do amplicon entre 100 e 300 pb; tamanho do iniciador entre 18 e 22 pb (ótimo a 20 pb); temperatura de *melting* (T_m) entre 50 e 60ºC (ótimo a 55ºC); conteúdo GC% entre 50 e 60% (ótimo a 55%); fator de autocomplementariedade máxima igual a 3; e fator de autocomplementaridade máxima na região 3´ igual a 0. Foram selecionados os pares de iniciadores mais concordantes com os parâmetros ajustados, os quais foram também analisados no programa NetPrimer (http://www.premierbiosoft.com/netprimer/) para análise de predição para auto-anelamento, dimerização ou dimerização cruzada entre cada par de iniciadores.

4.3.2 Validação por bioensaio

Foram selecionadas as enzimas com maiores diferenças de expressão ou, potencialmente associadas aos mecanismos de tolerância ao estresse salino para determinação da sua atividade. A ascorbato peroxidase, peroxidases, superóxido dismutase, fenilalanina amônia-liase e a metionina sintase foram selecionadas, porém não houve tempo hábil para a determinação da atividade de todas. Apenas a atividade da superóxido dismutase foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos da UFRPE em colaboração com o grupo da Dra. Lília Willadino.

Aproximadamente 200 mg de raiz foi macerada em nitrogênio líquido até homogeneização. Foi adicionado 2 mL de tampão de extração (tampão fosfato de potássio a 100 mM e pH de 7,8), logo em seguida a solução foi recolhida em microtubos e submetida a centrifugação a 14.000 g por 20 min. O sobrenadante foi recolhido para realização da análise de atividade da enzima.

O meio de reação no qual foi adicionado 100 µL do extrato apresentou metionina (13 mM), Riboflavina (0,002 mM) e o cloreto de azul de Nitrobluetetrazólio (NBT) a 0,075 mM. Os tubos contendo as amostras com o meio de reação foram colocados à exposição de uma luz a 30 W por 5 min, junto com os tubos utilizados para leitura do branco no espectrofotômetro. O branco escuro foi estabelecido por três réplicas que não foram expostas a luz. As leituras foram realizadas no escuro em espectrofotômetro a 560 nm de acordo com Giannopolitis & Ries (1977) com modificações.

A unidade de SOD foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Unidade de SOD} = \{[(\text{Abs} - \text{Bcoesc}) * 100] / \text{Bco claro}\} / 50 / 5$$

Onde: Abs = valor da absorbância; Bcoesc = leitura do branco no escuro; Bco claro = leitura do branco no claro; 50 = 50% de inibição do NBT; 5 = o tempo em min para ocorrer a reação.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISES FISIOLÓGICAS

5.1.1 Vazamento de eletrólitos (VE)

Após 2 h de exposição ao estresse por NaCl, as variedades analisadas não apresentaram aumentos significativos no percentual de vazamento de eletrólitos em relação ao tratamento controle (**Tabela 3**). Com o aumento da exposição ao NaCl, após 72 h, a variedade RB92579 (tolerante à seca) apresentou aumento de 24% e a RB855536 (sensível à seca) aumento significativo de 55% no VE, em relação ao tratamento controle, porém as variedades RB867515 (tolerante à seca) e RB72454 (sensível à seca) não apresentaram diferenças significativas com relação ao seu tratamento controle correspondentes.

Tabela 3. Valores médios de vazamento de eletrólitos (VE), teor relativo de água (TRA), potencial hídrico foliar (Ψwf), fotossíntese líquida (A), transpiração foliar (E) e condutância estomática (gs) em quatro variedades de cana-de-açúcar RB92579 e RB867515 (tolerantes à seca), RB72454 e RB855536 (sensíveis à seca) cultivadas em casa de vegetação após 2 e 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. Letras iguais e minúsculas entre as variedades e maiúsculas entre os tratamentos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Variedades de cana-de-açúcar	0 mM	200 mM (2 h)	0 mM	200 mM (72 h)
	VE (%)			
RB92579	19,021 aC	23,34 aBC	33,55 aAB	41,71 aA
RB867515	14,92 aA	18,88 aA	23,59 aA	27,47 bA
RB72454	20,75 aB	25,94 aB	32,87 aAB	42,11 aA
RB855536	24,71 aAB	20,02 aB	24,39 aB	37,76 abA
	TRA (%)			
RB92579	89,0 aA	78,0 aA	76,0 aA	83,0 aA
RB867515	94,0 aA	90,0 aA	82,0 aA	82,0 aA
RB72454	94,0 aA	88,0 aAB	80,0 aBC	73,0 aC
RB855536	84,0 aA	85,0 aA	77,0 aA	79,0 aA
	Ψwf (MPa)			
RB92579	-0,83 bcA	-0,87 cA	-1,02 aA	-1,44 aB
RB867515	-0,68 baA	-0,65 abA	-1,05 aB	-1,53 aC
RB72454	-0,52 aA	-0,45 aA	-1,04 aB	-1,53 aC
RB855536	-0,9 cA	-0,85 bcA	-0,98 aA	-1,42 aB
	A (μmol $CO_2 m^{-2} s^{-1}$)			
RB92579	14,73 aAB	10,55 aB	17,2 aA	1,82 bC
RB867515	17,06 aA	11,6 aA	17,21 aA	13,64 aA
RB72454	13,61 aAB	10,8 aAB	14,82 aA	7,32 abB
RB855536	16,27 aA	13,91 aA	18,3 aA	7,45 abB
	E (mmol H_2O $m^{-2} s^{-1}$)			
RB92579	2,04 aB	1,26 aBC	2,94 aA	0,71 bC
RB867515	1,88 aBC	1,47 aC	2,76 aA	2,28 aAB
RB72454	1,77 aA	1,66 aA	1,97 bA	2,36 aA
RB855536	1,50 aA	1,53 aA	1,67 bA	1,75 aA
	gs (mol H_2O $m^{-2} s^{-1}$)			
RB92579	0,19 aA	0,12 aB	0,17 aAB	0,02 bC
RB867515	0,12 bA	0,1 aAB	0,14 aA	0,06 abB
RB72454	0,12 bA	0,12 aA	0,13 aA	0,09 aA
RB855536	0,14 abA	0,14 aA	0,17 aA	0,07 abB

5.1.2 Teor relativo de água (TRA)

Para a variável TRA, não foram verificadas diferenças significativas entre as variedades analisadas, expostas ao estresse salino por 2 h. Os maiores percentuais

(90% e 88%) de TRA foram observados para RB867515 (tolerante à seca) e para a RB72454 (sensível à seca), respectivamente (**Tabela 3**). Após 72 h de exposição ao estresse salino, os percentuais de TRA apresentaram tendência à redução quando comparado ao tratamento controle após 2 h de estresse, porém redução significativa (17%) apenas foi verificada para a variedade RB72454.

5.1.3 Potencial hídrico foliar (Ψ_{wf})

De forma semelhante ao TRA, não foram verificadas diferenças significativas no Ψ_{wf} após 2 h de estresse salino em todas as variedades estudadas, em relação ao seu controle (**Tabela 3**). Porém, após 72 h de exposição ao NaCl, todas as variedades analisadas apresentaram redução significativa de seu Ψ_{wf} em relação à condição controle. Os valores mais negativos de -1,53 MPa foram verificados para as variedades RB867515 e RB72454, correspondendo a reduções significativas de 46% e 47%, respectivamente.

5.1.4 Fotossíntese líquida (A), transpiração foliar (E) e condutância estomática (gs)

Apesar das plantas apresentarem reduções na fotossíntese (A) após 2 h de exposição ao estresse salino, as mesmas não as apresentaram de forma significativa (**Tabela 3**). Após 72 h de indução ao estresse, apenas a variedade RB867515 não apresentou redução significativa na fotossíntese líquida. Dentre as variedades que apresentaram reduções significativas, o maior percentual de redução foi observado na variedade RB92579 (89%).

Para a transpiração foliar, houve reduções de 38% e 29% nas variedades de cana-de-açúcar consideradas tolerantes à seca (RB92579 e RB867515, respectivamente) após 2 h de exposição à salinidade. Porém com 72 h a transpiração foliar apenas foi reduzida na variedade RB92579 (76%) (**Tabela 3**).

Após 2 h de exposição ao sal, apenas a variedade RB92579 (tolerante à seca) apresentou reduções significativas (37%) na condutância estomática com relação ao tratamento controle, e, continuou reduzindo drasticamente após 72 h

(88%), apresentando o maior percentual de redução dentre as variedades estudadas (**Tabela 3**). Dentre as variedades sensíveis à seca, a RB855536 apresentou reduções significativas na condutância estomática em relação à condição controle após 72 h de estresse, enquanto a RB72454 não reduziu significativamente quando comparada a condição controle.

Seleção das variedades de cana-de-açúcar para análise proteômica

Com base nos parâmetros fisiológicos analisados para as variedades de cana-de-açúcar tolerantes à seca, a variedade RB867515 foi a que apresentou, dentro deste estudo, respostas mais associada à tolerância à salinidade em comparação à variedade RB92579. Pois, foi a única variedade que manteve a fotossíntese após 72 h de estresse sem diferenciar significativamente das plantas em condição controle, menor vazamento de eletrólitos, além de não apresentar alteração no TRA, bem como na condutância estomática.

Dentre as variedades sensíveis à seca, a variedade RB855536 foi considerada a mais sensível à salinidade, pois embora as variedades tenham se comportado de forma semelhante em todas as variáveis analisadas, essa apresentou maiores reduções significativas com relação ao tratamento sem NaCl quando comparada à RB72454.

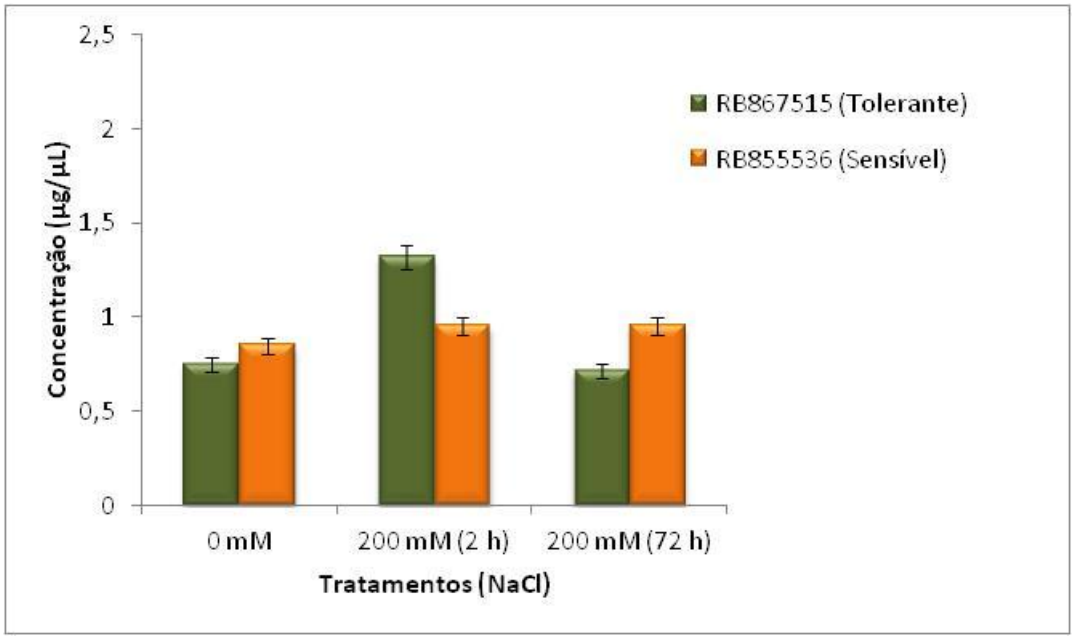
Portanto, com base nos parâmetros fisiológicos, as etapas seguintes desse estudo se restringiram a essas duas variedades contrastantes em respostas associadas ao estresse por 200 mM de NaCl.

5.2 ANÁLISE PROTEÔMICA

5.2.1 Raiz

5.2.1.1 Extração, quantificação e integridade das proteínas

A extração pelo método fenólico apresentou-se eficiente, dada a quantidade satisfatória de proteínas obtidas em 1 g de raiz (0,211 mg/g a 0,395 mg/g) em todos os tratamentos analisados para posterior análise 2D. Os valores médios da concentração de proteínas de raiz das três réplicas biológicas variaram de 0,706 µg/µL a 1,318 µg/µL para cada tratamento e variedade (**Figura 7**).



* Média (n=3) e ± = erro padrão

Figura 7. Quantificação através do método Bradford (1976) de proteínas totais de raiz das variedades de cana-de-açúcar RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) cultivada em casa de vegetação após 2 e 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl.

Após 2 h da exposição ao sal foi observado que a variedade tolerante aumentou significativamente a quantidade de proteínas solúveis quando comparada com a variedade sensível. O contrário foi visto após 72 h de estresse salino, onde a

variedade sensível apresentou aumento significativo em relação à variedade tolerante. As proteínas extraídas apresentaram-se íntegras e sua qualidade pôde ser visualizada em gel SDS-PAGE. Além disso, o resultado está proporcionalmente de acordo com os dados obtidos na quantificação (**Figura 8**).

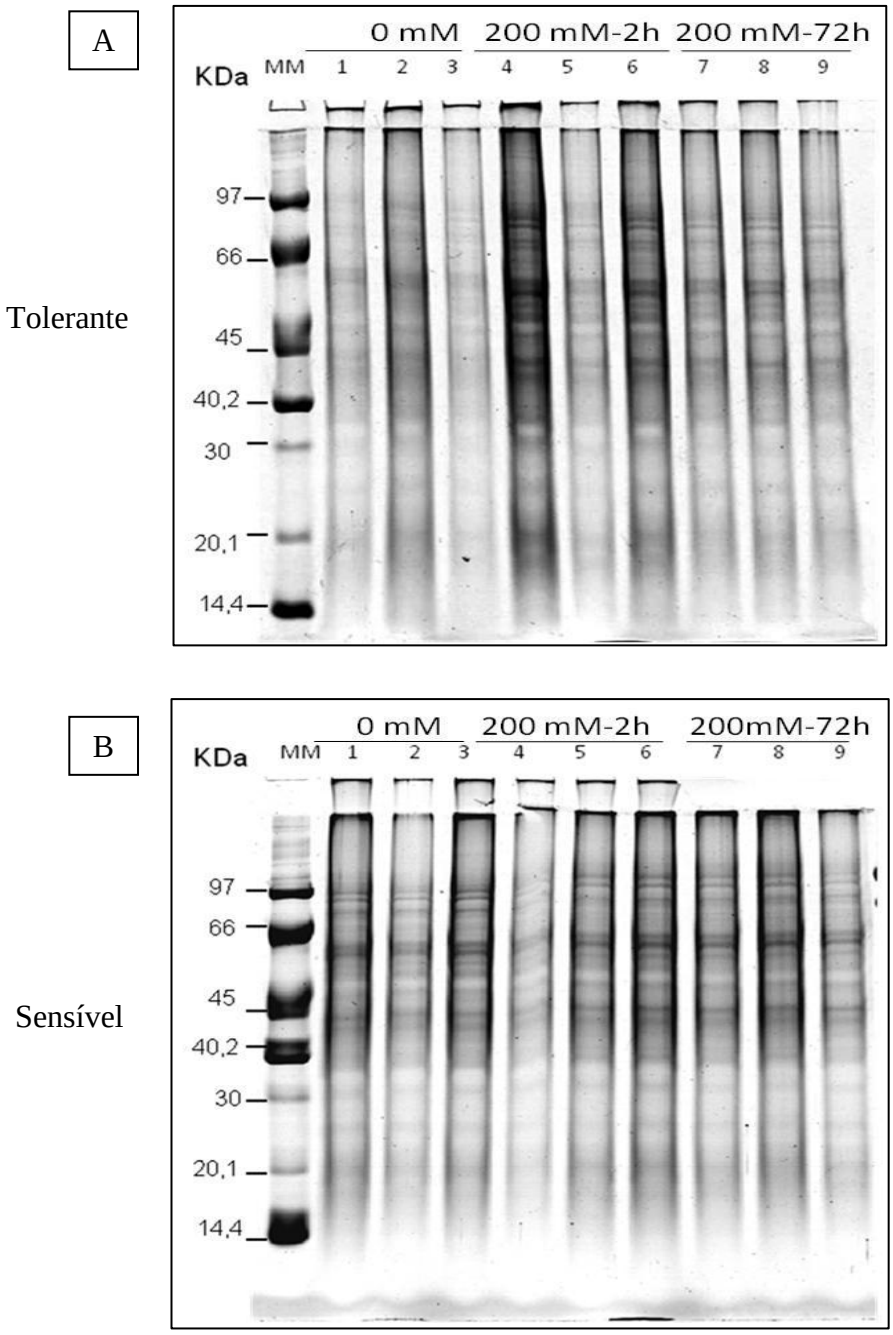


Figura 8. Gel SDS-PAGE (poliacrilamida 12,5%) de proteínas de raiz de cana-de-açúcar. A) variedade RB867515 (tolerante), e (B) variedade RB855536 (sensível) cultivadas em casa de vegetação após 2 e 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. MM: Marcador Molecular (KDa); 1 - 3: 3 repetições do tratamento 0 mM; 4 – 6: 3 repetições do tratamento 200 mM (após 2 h de estresse); 7 - 9: 3 repetições do tratamento 200 mM (após 72 h de estresse).

5.2.1.2 Gel 2D PAGE

Foram preparados géis 2D PAGE de três réplicas biológicas de cada condição salina analisada para as duas variedades cana-de-açúcar. Umas das réplicas do gel de raiz para cada tratamento e variedade podem ser observadas nas **Figuras 9** e **10**.

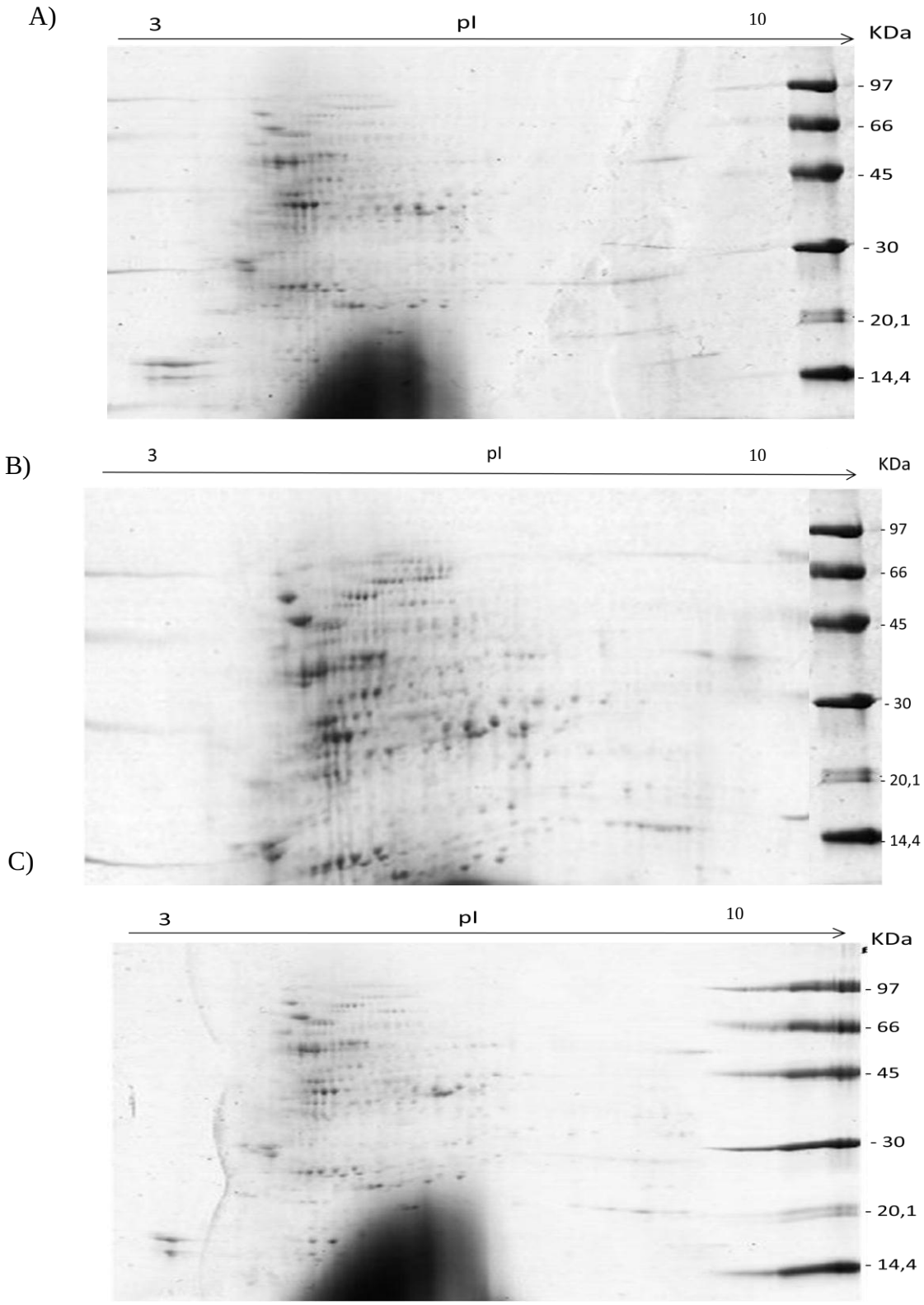


Figura 9. Géis 2D (poliacrilamida 12,5%) de proteínas totais de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) sob salinidade cultivada em casa de vegetação corados com Coomassie blue. As proteínas (60 µg) foram separadas em fitas IPG de 11 cm com pH de 3 a 10. A) 0 mM de NaCl. B) Após 2 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. C) Após 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl.

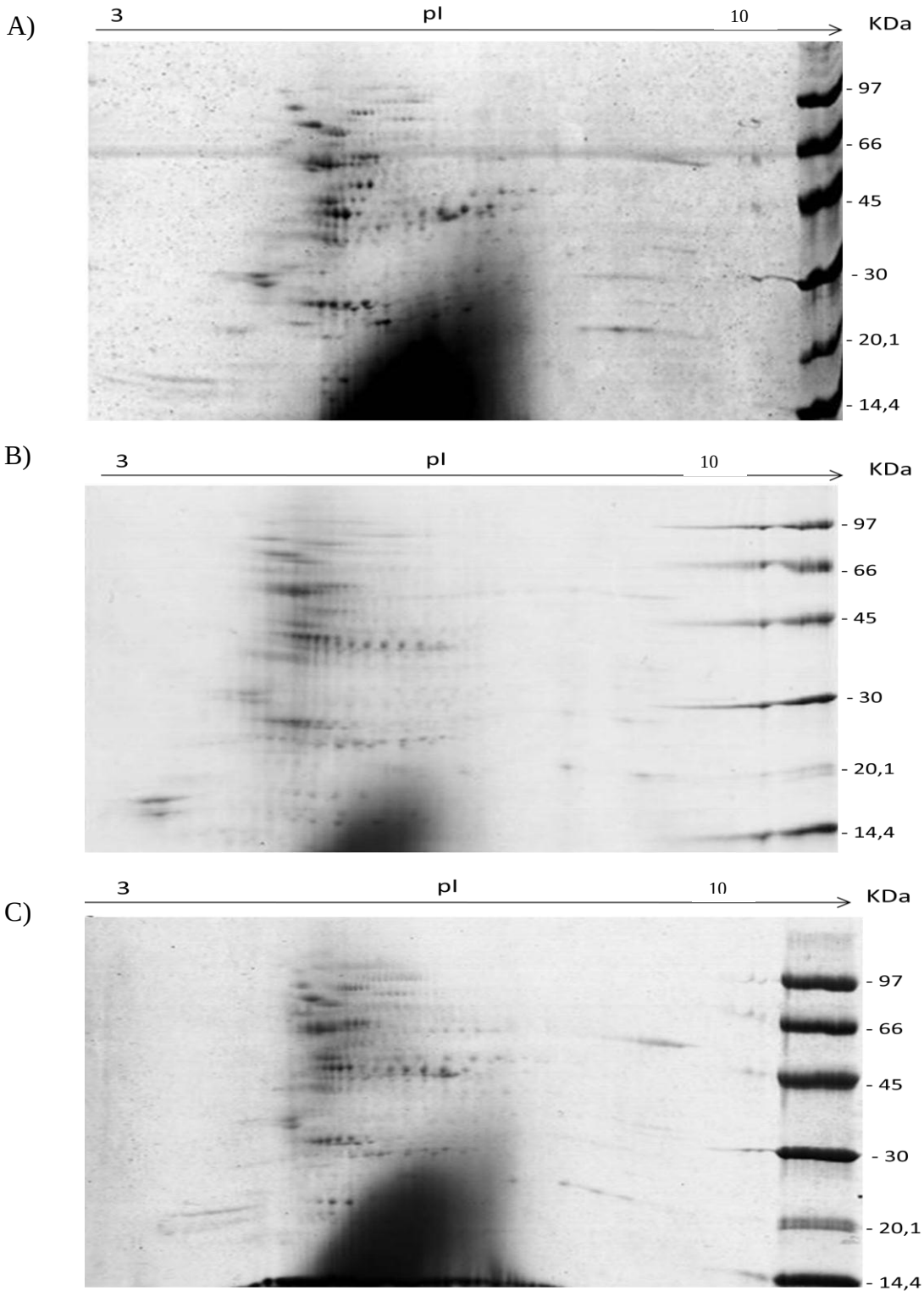


Figura 10. Géis 2D (poliacrilamida 12,5%) de proteínas totais de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB855536 (sensível) sob salinidade cultivada em casa de vegetação coradas com Coomassie blue. As proteínas (60 µg) foram separadas em fitas IPG de 11 cm com pH de 3 a 10. A) 0 mM de NaCl. B) Após 2 h de exposição ao estresse por 200 mM de NaCl. C) Após 72 h de exposição ao estresse por 200 mM de NaCl.

5.2.1.3 Análise das imagens

Nos géis 2D foi observado um perfil proteômico semelhante entre as variedades e entre os tratamentos analisados. O coeficiente de correlação entre as três réplicas biológicas dentro de um mesmo tratamento foi significativo, variando de 0,7057 a 0,8701, permitindo assim o andamento da análise. Os *spots* foram distribuídos por massa molecular entre 14,4 e 97 kDa, e apresentaram maior concentração na faixa preferencial de pI entre o pH 5 e 7.

Foi encontrada uma variação média de 94 a 144 *spots* totais, de 78 a 132 para os *spots* comuns e 13 a 25 para os *spots* exclusivos nos géis de raiz para ambas as variedades (**Figura 11**). Foi detectada uma maior quantidade de *spots* totais nos géis de raiz da variedade tolerante (RB867515) para todos os tratamentos analisados em relação à variedade sensível à seca (RB855536).

Novamente, foi observado que em uma análise quantitativa da detecção de *spots* no gel quando se comparou as condições salinas a variedade tolerante (RB867515) após 2 h de estresse por 200 mM de NaCl aumentou seu número totais de *spots* em relação a condição controle enquanto que a variedade sensível (RB855536) mostrou o inverso.

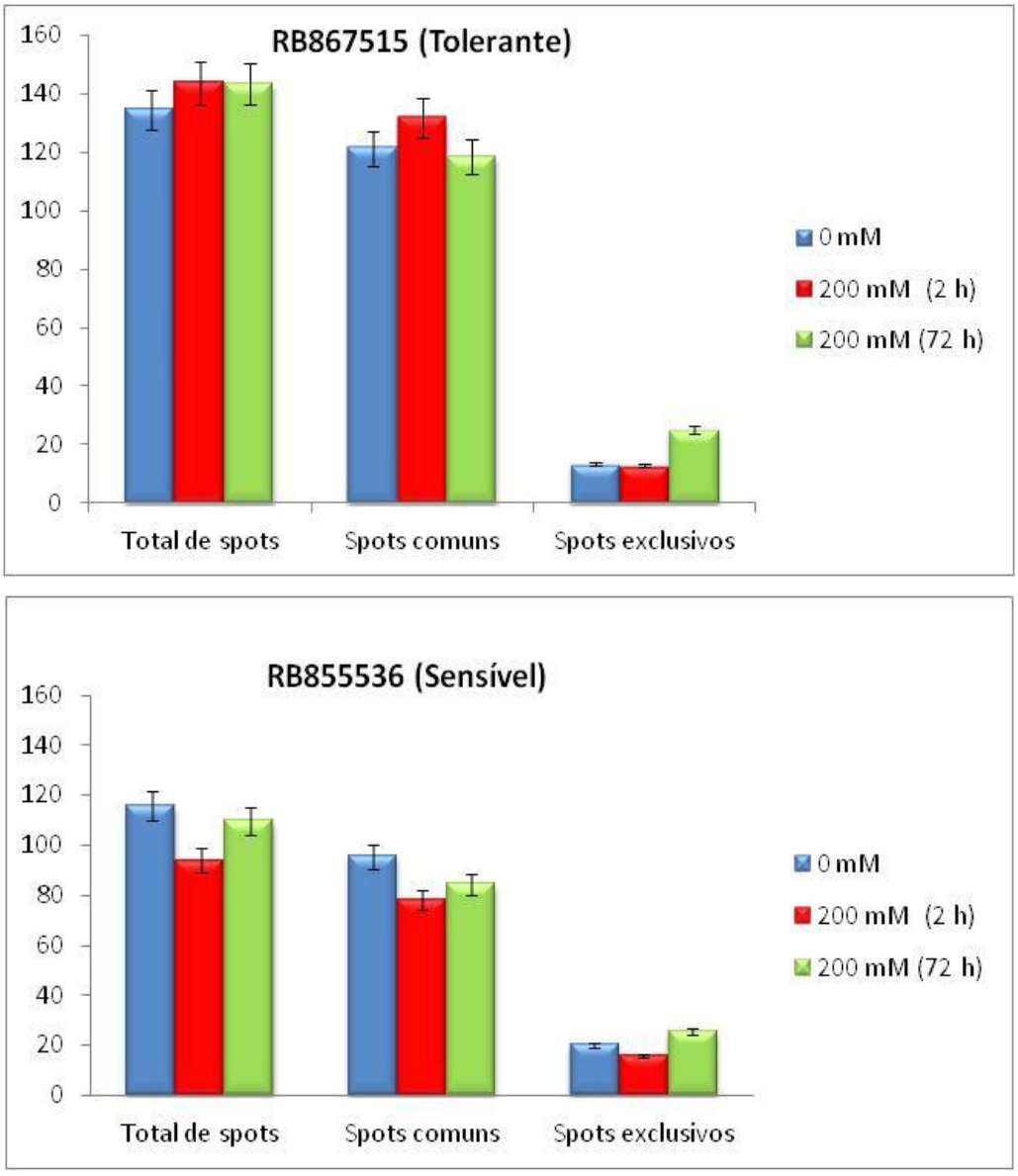


Figura 11. Valores médios do número total de *spots*, *spots* comuns e exclusivos de três réplicas biológicas para cada condição salina de raiz de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) sob estresse por 200 mM de NaCl, após 2 e 72 h de exposição ao sal.

Nas comparações realizadas pelo programa Image Master 2D Platinum v7.05 (GE Life Sciences), apenas quando se comparou as variedades de cana-de-açúcar sob o tratamento de 200 mM de NaCl (após 2 h de estresse) encontrou-se um número maior de *spots* exclusivos em relação aos número de *spots* comuns, o que poderia ser esperado já que as variedades apresentaram um comportamento

inverso em relação ao número total de *spots* na condição de salinidade em relação à condição controle (**Tabela 4**).

Tabela 4. Total de spots comuns e exclusivos de raiz de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) para cada comparação de géis analisadas no programa Image Master 2D Platinum v7.05 (GE Life Sciences).

Variedade	Comparações (de NaCl)	*Spots* comuns	*Spots* exclusivos
RB867515	0 mM x 200 mM (2 h)	122	84
	0 mM x 200 mM (72 h)	127	49
	200 mM (2h) x 200 mM (72 h)	112	86
RB855536	0 mM x 200 mM (2 h)	58	56
	0 mM x 200 mM (72 h)	86	48
	200 mM (2 h) x 200 mM (72 h)	67	56
RB867515 x RB855536	0 mM	93	67
	200 mM (2 h)	69	109
	200 mM (72 h)	89	78

As imagens relativas às comparações entre tratamentos e variedades realizadas no programa Image Master 2D Platinum v7.05 (GE Life Sciences) podem ser visualizadas nas **Figuras 12** e **13**. Os *spots* envoltos com a cor verde indicam os *spots* comuns às condições salinas e controle, encontrados nas comparações entre os géis e os *spots* envoltos com a cor vermelha são os *spots* ditos exclusivos de apenas uma condição.

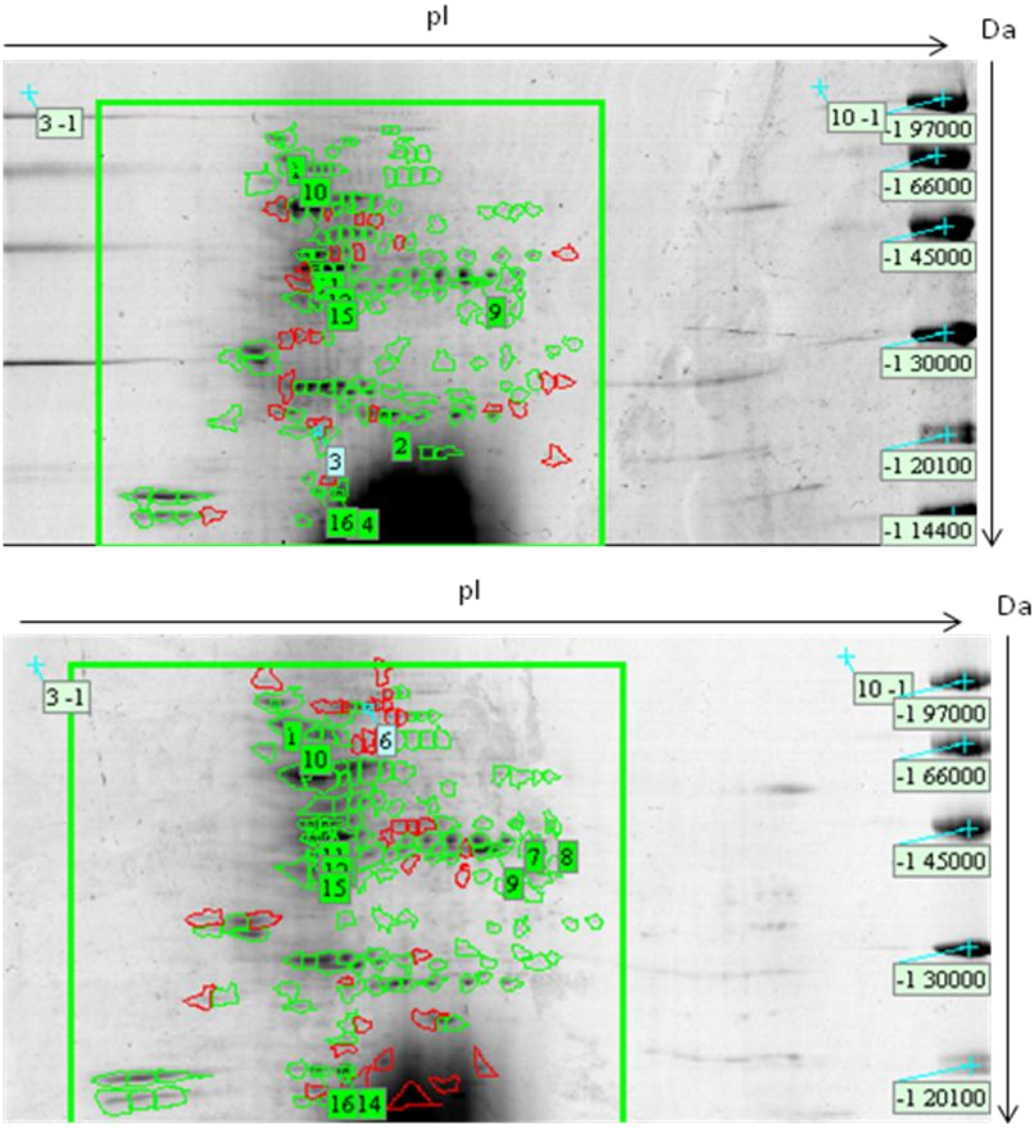


Figura 12. Análise comparativa entre os géis de raiz da variedade de cana-de-açúcar RB867515 (tolerante) sob estresse por 200 mM de NaCl cultivada em casa de vegetação. A) 0 mM de NaCl x B) 200 mM de NaCl após 72 h de exposição ao estresse (Gradiente de 11 cm). *Spots* envoltos com a cor verde: comuns as duas condições; *spots* envoltos com a cor vermelha: exclusivos de uma condição.

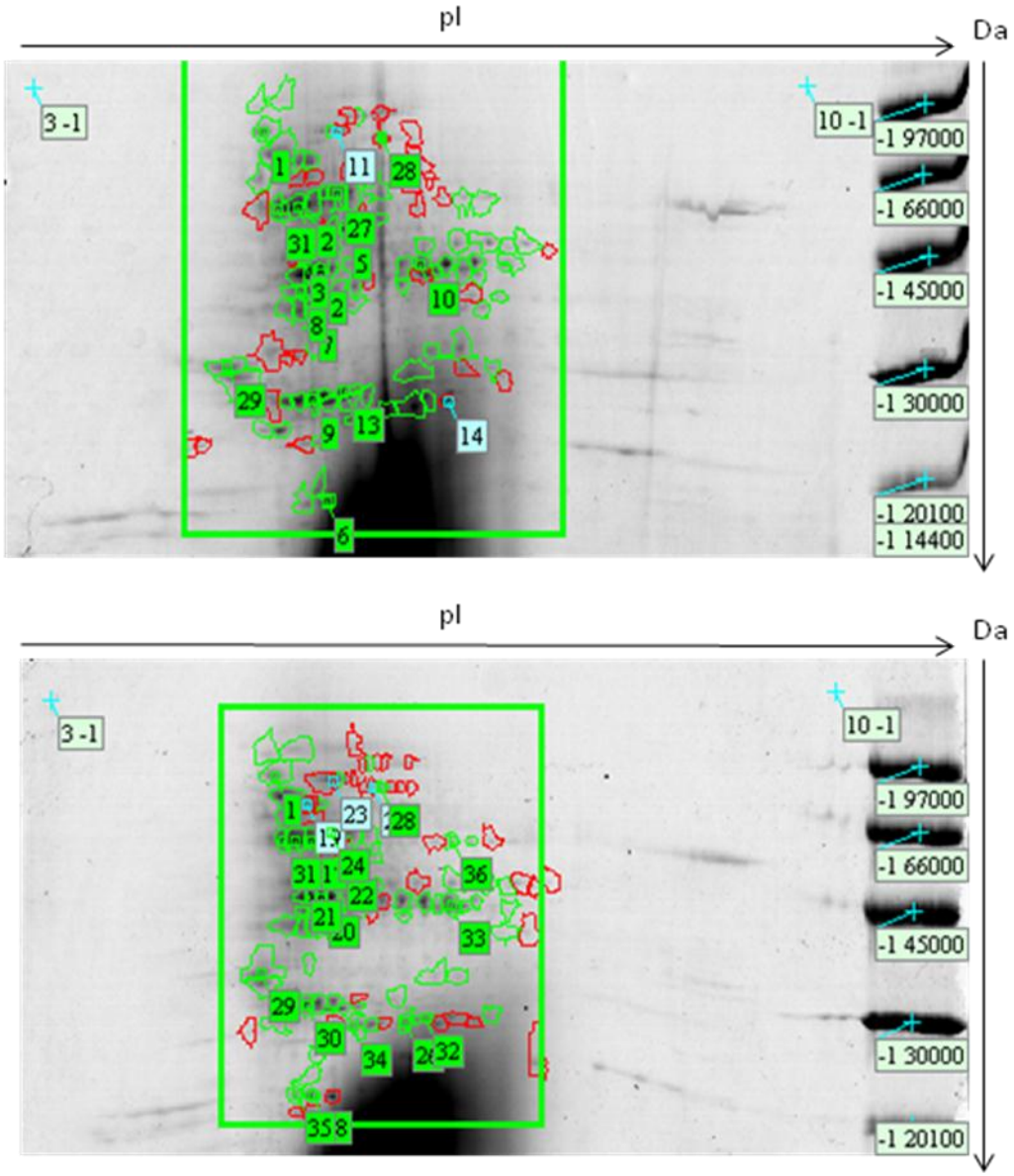


Figura 13. Análise comparativa entre os géis de raiz da variedade de cana-de-açúcar RB855536 (sensível) sob estresse por 200 mM de NaCl cultivada em casa de vegetação. A) 0 mM de NaCl x B) 200 mM de NaCl após 72 h de exposição ao estresse (Gradiente de 11 cm). *Spots* envoltos com a cor verde: comuns as duas condições; *spots* envoltos com a cor vermelha: exclusivos de uma condição.

Nas séries de comparações onde o parâmetro condição salina foi adotado como variável verificou-se expressão diferencial dos *spots* em ambas as variedades. Foi selecionado um total de 83 *spots* com a razão de variação da porcentagem de volume ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05, onde 47 *spots* diferencialmente expressos foram selecionados para a variedade tolerante e 36 *spots* para a variedade sensível incluindo os *spots* comuns e exclusivos. Apenas para a comparação 0 mM x 200 mM (72 h) da variedade RB855536 não foram encontrados *spots* comuns diferencialmente expressos (**Figura 14**).

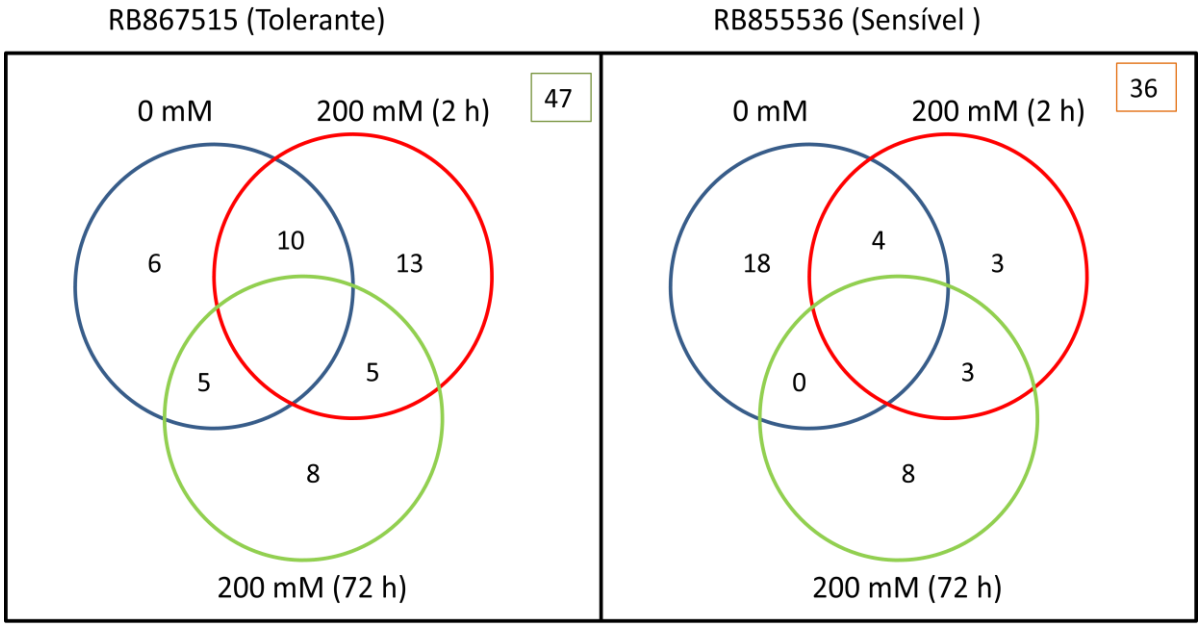


Figura 14. Total de *spots* diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) cultivada em casa de vegetação sob estresse por 200 mM de NaCl. Foram selecionados para digestão e identificação os *spots* que apresentaram a razão da %Vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05.

Mais uma vez, foi verificado em uma análise quantitativa dos *spots* diferenciais que o número de s*pots* da RB867515 (tolerante) após 2 h de estresse salino apresenta-se em maior quantidade tanto para os *spots* comuns à condição controle, quanto para os exclusivos, quando comparada com a RB855536 (sensível) nesta mesma condição salina.

Na comparação entre variedades dentro da mesma condição salina (2 h ou 72 h) também foram verificados *spots* diferencialmente expressos com maior número de

spots exclusivos encontrados na variedade tolerante à salinidade para ambas as condições salinas (**Figura 15**).

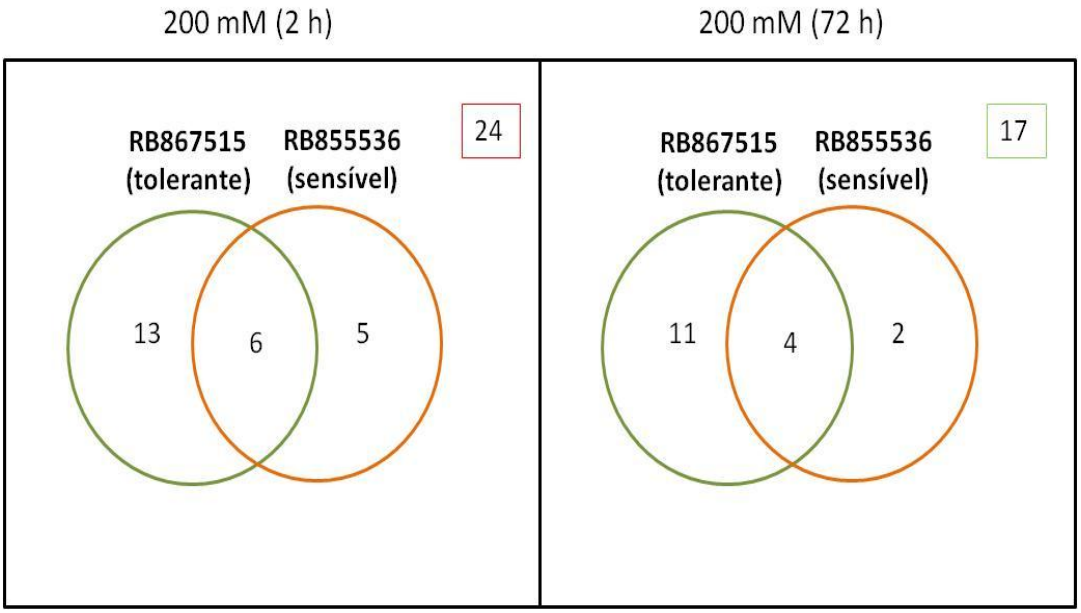


Figura 15. Total de *spots* diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) X RB855536 (sensível) sob estresse por 200 mM de NaCl cultivadas em casa de vegetação. Foram selecionados para digestão e identificação os *spots* que apresentaram a razão da %Vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05.

5.2.1.4 Identificação e anotação presumível dos peptídeos diferencialmente expressos em condições de salinidade

5.2.1.4.1 Peptídeos com variação apenas para a razão de %vol

Foi selecionado um total de 223 *spots* que apresentaram razão da variação de %vol ≥ 1,5 distribuídos nas condições salinas analisadas (**Tabela 5**). Dentre esses 129 *spots* foram selecionados para a variedade tolerante (RB867515) e 94 *spots* para a variedade sensível (RB855536).

Tabela 5. Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol ≥ 1,5 para cada variedade RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível).

Variedade	*Spots* selecionados com a razão de variação de %vol ≥ 1,5
RB867515	129
RB855536	94
Total	223

Foram enviados para sequenciamento via espectrometria de massas no Instituto de Química da UNICAMP um total de 150 *spots* digeridos de raiz das duas variedades estudadas. Dentre esses, foram sequenciados com êxito um total de 96 peptídeos diferencialmente expressos (DEPs), sendo 46 para a variedade RB867515 (tolerante) e 50 para a RB855536 (sensível). As sequências de aminoácidos dos DEPs após serem comparadas com o banco de dados de proteínas (Uniprot) para identificação foram distribuídas em 19 categorias de acordo com o seu processo biológico ou função molecular através de sua anotação no GO presente no banco de dados (**Figura 16**).

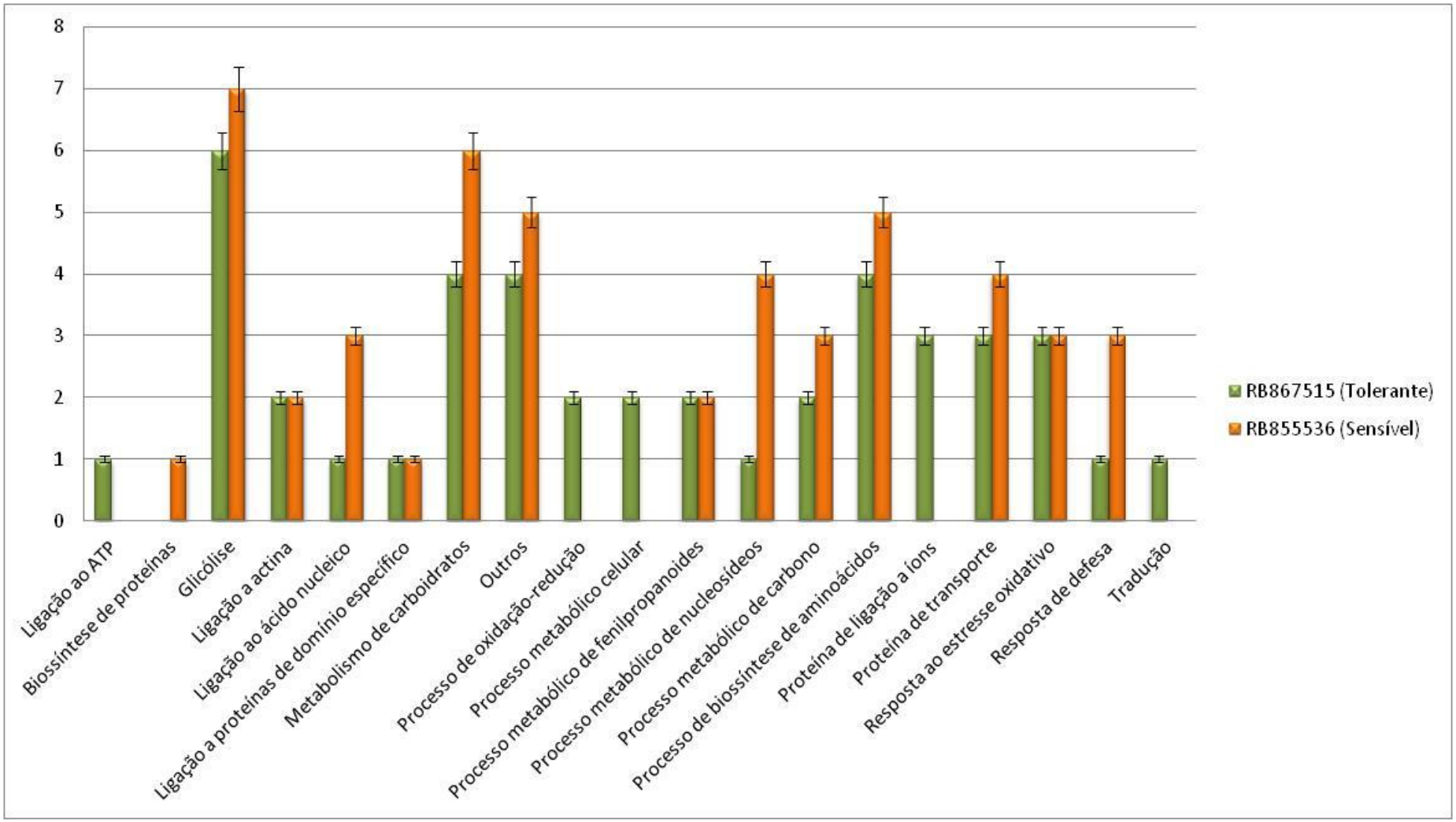


Figura 16. Distribuição dos peptídeos diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) e sensível (RB855536) em condições de salinidade de acordo com sua anotação no GO.

Numa comparação entre as variedades foram observados perfis distintos de concentração de DEPs nas categorias listadas. As categorias que englobam as proteínas de: metabolismo de carboidrato como a frutoquinase-2; processo metabólico de nucleosídeo (adenina fosforibosil transferase, nucleosídeo difosfato quinase e a proteína predita Sb08g019790); processo metabólico de carbono (S-adenosilmetionina sintase e Adenosilhomocisteinase); proteínas de transporte (proteína nuclear de ligação ao GTP RAN3 e RAN2, ATP sintase subunidade alfa mitocondrial e a YLP); e as de resposta de defesa (proteína relacionada à patogênese 10a) apresentaram uma maior concentração de peptídeos diferencialmente expressos na variedade sensível (RB855536) em comparação com a tolerante (RB867515). Além disso, houve categorias presentes em apenas uma das variedades em estudo, como no caso das proteínas de ligação ao ATP (Proteína ciclo de divisão celular 48), processo metabólico celular (D-TDP glicose-desidratase), processo de óxido redução (Dihydrolipoyl desidrogenase, aldeído desidrogenase), proteínas de ligação a íon (Germin-like protein 8-9, hidratase aconitato predita 1 e proteína predita Sb09g026790) e de tradução (proteína ribossomal 40S S12), que foram diferencialmente expressas somente na variedade tolerante (RB867515).

Do total de DEPs para a variedade tolerante (RB867515), 17,5% tiveram sua expressão reduzida e 43,5% induzida após 2 h de estresse por 200 mM de NaCl. Após 72 h de exposição ao estresse também foi verificado uma maior porcentagem (26,1%) de peptídeos que tiveram a expressão induzida para a variedade tolerante (**Figura 17**).

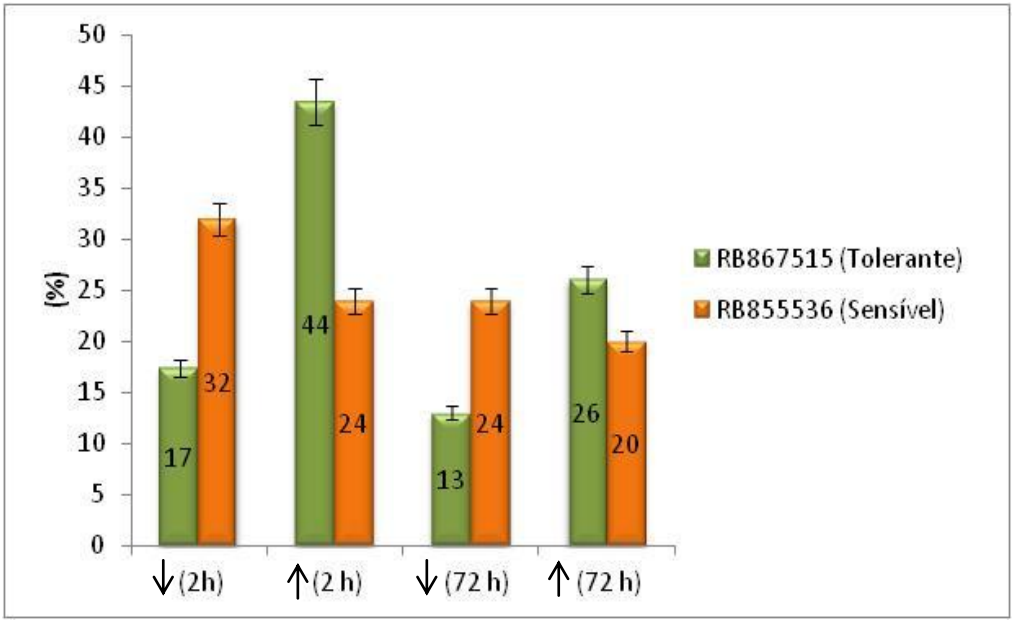


Figura 17. Porcentagem de peptídeos diferencialmente expressos de raiz das variedades RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) que apresentaram sua expressão induzida (↑) ou inibida (↓) sob estresse por 200 mM de NaCl após 2 h e 72 h de exposição.

Já para a variedade sensível, os peptídeos que tiveram a expressão inibida nas plantas em condição de salinidade apresentaram a maior porcentagem dos peptídeos diferencialmente expressos após 2 h (32%) e 72 h (24%) de estresse.

Além de comparações entre variedades e níveis de expressão de proteínas, ao realizar uma comparação entre condições salinas, também foi observado perfis distintos de expressão de peptídeos dentro das variedades verificada por diferenças no acúmulo dos DEPs distribuídos nas 19 categorias listadas (**Figura 18**).

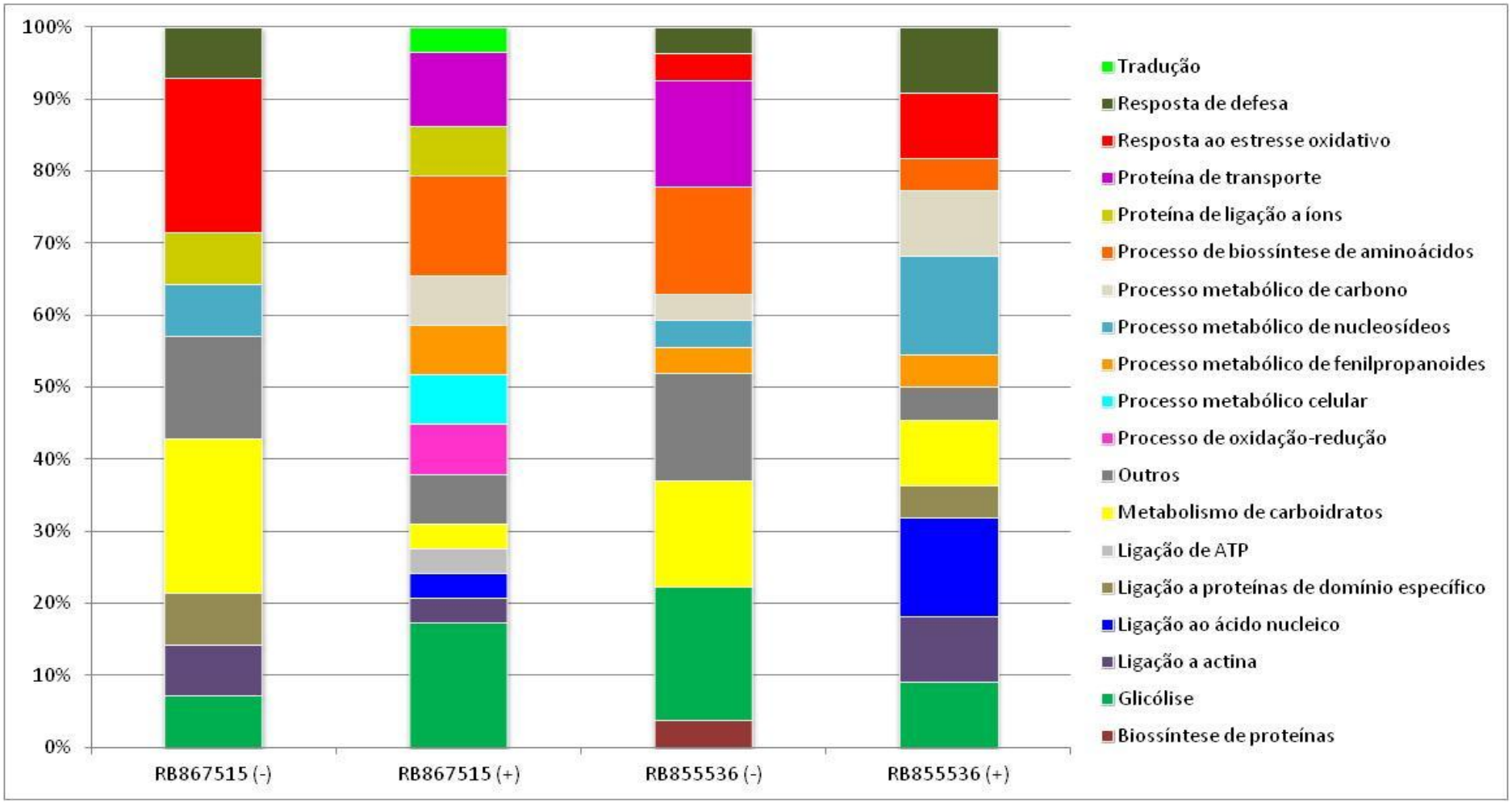


Figura 18. Peptídeos de raiz de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) que apresentaram sua expressão inibida (-) ou induzida (+) em condições de salinidade por 200 mM de NaCl de acordo com sua anotação no GO.

As proteínas que participam da via glicolítica, como a gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase e a frutose bifosfato aldolase, tiveram sua expressão inibida em condições sob estresse salino na variedade sensível (RB855536) enquanto que na tolerante (RB867515) além das já citadas, a fosfoglicerato quinase e a isomerase triosefosfato citosólica foram induzidas. A categoria que englobou as proteínas que se ligam aos ácidos nucleicos foi exclusiva de salinidade para ambas as variedades, porém com maior concentração de peptídeos com expressão induzida na variedade sensível. Proteínas que se ligam a domínios específicos (proteína 14-3-3) foram inibidas em condições de salinidade na variedade tolerante e o inverso foi visto na sensível. Já as proteínas da categoria de óxido-redução, processo metabólico de carbono e de tradução apresentou expressão induzida exclusivamente na variedade RB867515 (tolerante) em plantas em condição de salinidade. A categoria que englobou proteínas de processo metabólico de nucleosídeo como a adenina fosforibosiltrasferase foi inibida na variedade tolerante, já na variedade sensível além da adenina fosforibosiltrasferase, a nucleosídeo difosfato quinase foi induzida em plantas em condição de estresse por sal.

Nas categorias que foram incluídas as proteínas de ligação a actina (fator de depolimerização de actina 3), ligação ao ATP (proteína de ciclo de divisão celular 48), de biossíntese de fenilpropanoides (fenilalanina amônia-liase), biossíntese de aminoácidos (metionina sintase, glutamina sintetase) e proteínas de transporte (proteína nuclear de ligação ao GTP Ran-3, Ran 2, ATP sintase subunidade alfa, mitocondrial e YLP) foram exclusivas da condição de salinidade na variedade tolerante, sendo que as proteínas de ligação ao ATP, de biossíntese de aminoácidos e de transporte também apareceram na variedade sensível, porém com expressão inibida nessa mesma condição. O grupo de proteínas que participam da biossíntese de fenilpropanoides também apresentou expressão aumentada na variedade sensível (RB855536), embora com menor percentual em relação à variedade tolerante sob salinidade.

De forma contrária, as categorias de processo metabólico de carbono (serina hidroximetil transferase, S - adenosilmetionina sintetase e adenosilhomocisteinase), resposta ao estresse oxidativo (Sb01g038760, superóxido dismutase [Mn] e Sb02g044060) e de respostas de defesa (proteína relacionada a patogênese 10a) apresentaram maior acúmulo na variedade sensível em plantas sob estresse salino.

Proteínas de metabolismo de carboidrato (gliceraldeído desidrogenase 3 fosfato, citossólica, sacarose sintase - 2, Sb01g033060, frutoquinase-2 e malato desidrogenase) apresentaram expressão reduzida em ambas às variedades, porém uma redução mais acentuada foi vista na variedade tolerante (RB867515).

5.2.1.4.2 Peptídeos com razão de variação de %vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05

RB867515 (Tolerante)

Dentre os 47 *spots* selecionados com razão de %vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05 para digestão e identificação via espectrometria de massas, 17 foram identificados com êxito (**Tabela 6 e 7**) e 29 não puderam ser identificados por contaminação devido ao manuseio no momento da digestão. Alguns apresentaram sequências de aminoácidos que se comparavam nos bancos de dados com a queratina humana e até mesmo com a tripsina que foi a enzima utilizada para fazer a digestão dos *spots*. Dentre os 17 peptídeos identificados foram encontrados dois *spots* correspondentes à proteína fosfoglicerato quinase, dois à metionina sintase e dois para a proteína predita Sb01g036580.

Tabela 6. Anotação dos peptídeos diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) em condições de salinidade**.**

Spot ID	***Macth ID***	**Anotação**	***Abreviatura***	***Score***	**Acesso**	**Espécie**	**e-Value Uniprot**	**pI**	**MM**
988	86	ATP sintase subunidade alfa	ATPA	118	Q6R987	*Zea mays*	2.0×10-3	5,844	63636
295	2	Fator de depolimerização de actina 3	ADF 3	57	Q41764	*Z. mays*	9.4×10-2	5,435	14012
956	151	Fenilalanina amônia-liase	PAL	55	Q9MAX1	*Catharanthus roseus*	4.0×10-11	6,825	74206
90	160	Fosfoglicerato quinase	PGK	145	Q850M6	*T. urartu*	6.0×10-9	5,717	40713
1037	123	Fosfoglicerato quinase	PGK	139	Q9SAJ4	*Arabidopsis thaliana*	7.0×10-2	5,681	50204
1076	74	Gliceraldeído desidrogenase 3 fosfato, citossólica	GAPDH	478	Q6V785	*Hordeum vulgare*	2.0×10-18	7,225	41495
1203	113	Isomerase triosefosfato citosólica	TPI	202	P12863	*Z. mays*	8.0×10-6	5,64	24996
934	155	Metionina sintase	MetS	85	Q4LB12	*H. vulgare*	1.0×10-7	5,809	86489
17	141	Metionina sintase	MetS	235	Q8W529	*Z mays*	6.0×10-11	5,884	80341
245	150	Proteína 14-3-3	14-3-3	215	Q7XY16	*Triticum aestivum*	5.0×10-8	5,570	20313
932	157	Proteína de ciclo de divisão celular 48	CDC48	243	Q7XE16	*Oryza sativa subsp. Japonica*	2.0×10-14	5,437	90717
217	124	Proteína predita Sb01g033060	Sb01g033060	540	C5WXJ1	*Sorghum bicolor*	6.0×10-15	6,118	21933
119	130	Proteína predita Sb01g036580	Sb01g036580	288	C5X1Q1	*S. bicolor*	3.0×10-10	6,867	36104
84	169	Proteína predita Sb01g036580	Sb01g036580	279	C5X1Q1	*S. bicolor*	3.0×10-10	6,947	38056
277	10	Proteína relacionada a patogênese 10a	PR-10	147	Q4VQB5	*S. bicolor*	2.0×10-5	5,558	15803
298	128	Proteína ribossomal 40S S12	RPL12	86	Q9XHS0	*H. vulgare*	4.0×10-11	5,391	18428
226	14	Superóxido dismutase [Mn], mitocondrial	Mn-SOD	421	Q43008	*O. sativa subsp. Japonica*	7.0×10-7	6,145	21639

Tabela 7. Peptídeos diferencialmente expressos conforme sua presença (+) ou ausência (-) em raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) em condições de salinidade**.**

Anotação	0 mM	200 mM (2h)	200 mM (72)	Razão %vol	Anova
ATPA	+	+	+	1,799	0,032
ADF 3	+	+	+	1,554	0,024
PAL	-	+	-	-	0,005
PGK	+	+	-	-	0,001
PGK	+	+	-	-	0,001
GAPDH	+	+	+	1,522	0,029
TPI	-	+	-	-	0,002
MetS	-	+	+	-	0,0005
MetS	-	+	+	-	0,001
14-3-3	+	-	-	-	0,007
CDC48	-	+	-	-	0,006
Sb01g033060	+	-	+	-	0,00005
Sb01g036580	+	-	+	-	0,002
Sb01g036580	+	-	+	-	0,011
PR-10	+	+	+	1,5981	0,015
RPL12	-	+	+	-	0,001
Mn-SOD	+	+	+	2,6102	0,043

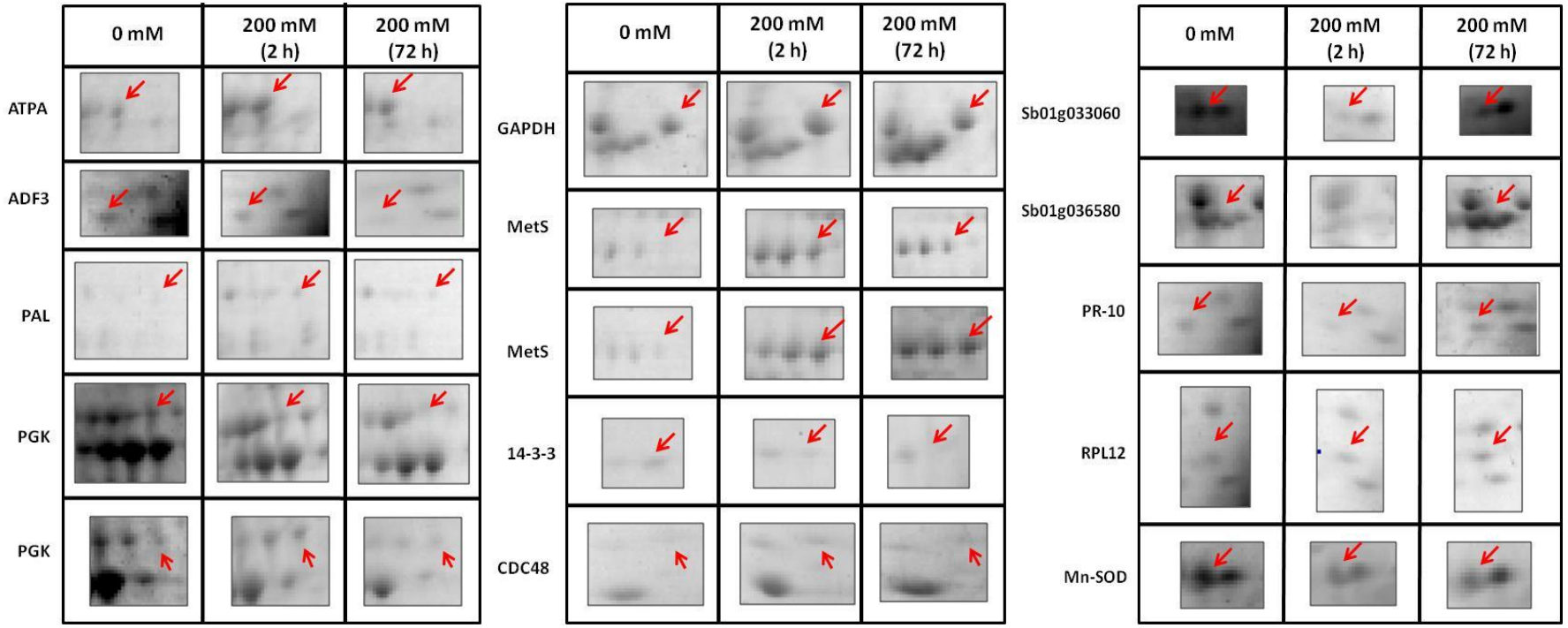


Figura 19. Representação de 15 *spots* dos 17 *spots* diferencialmente expressos em géis de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) em condições de salinidade cultivadas em casa de vegetação.

Todos os peptídeos confrontados com banco de dados de proteínas apresentaram alta similaridade com proteínas de plantas e várias de resposta ao estresse por sal. Por meio da variável %vol foi possível verificar a variação do nível de expressão dos peptídeos nas condições salinas analisadas (**Figura 20**).

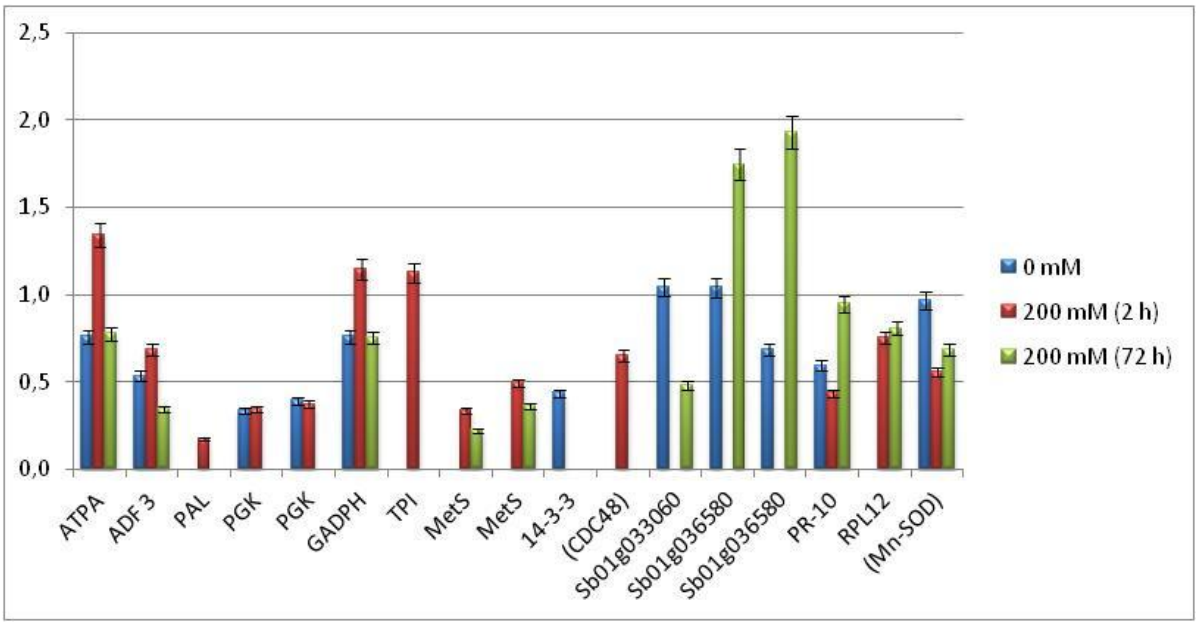


Figura 20. Porcentagem de volume dos peptídeos diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) sob estresse por 200 mM de NaCl (após 2 h e 72 h) cultivadas em casa de vegetação.

Em relação aos peptídeos comuns nas condições salinas que apresentaram expressão reduzida após 72 h de estresse por sal, foram observados o ADF3, a Sb01g033060 e a Mn-SOD. Dentre esses, o ADF3 aumentou a expressão após 2 h de estresse, a Mn-SOD apresentou maior redução quando comparada com as plantas da condição controle e a Sb01g033060 foi inibida nessa condição. Já a proteína 14-3-3 foi totalmente inibida em plantas em condições de salinidade.

Foram verificadas também proteínas que foram expressas somente em plantas sob estresse salino como a RPL12 e a MetS, sendo que a última com expressão reduzida após 72 h em relação a 2 h de estresse.

A ATPA, GAPDH, PAL, CDC48 e TPI foram mais expressas após 2 h de estresse por sal, as últimas (PAL, CDC48 e TPI) foram exclusivas dessa condição.

Dentre os peptídeos comuns que apresentaram indução na expressão após 72 h de estresse por sal em relação à condição controle foram encontradas a PR-10

e as duas proteínas Sb01g036580. A PGK, de forma inversa, apresentou expressão inibida nessa condição.

RB855536 (Sensível)

De um total de 36 *spots* diferencialmente expressos em condições de salinidade com razão de %vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05, 22 *spots* após apresentarem sua sequência de aminoácidos confrontadas no banco de dados apresentaram alta correlação com proteínas de plantas, inclusive da mesma família a qual pertence à cana-de-açúcar (**Tabela 8 e 9)**. Os 14 *spots* restantes não foram possíveis de serem sequenciados via MS por contaminação com queratina humana, ou por grande quantidade a enzima de restrição.

Tabela 8. Anotação dos peptídeos diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB855536 (sensível) em condições de salinidade.

Spot ID	*Macth ID*	**Anotação**	***Abreviaturas***	***Score***	**Acesso**	**Espécie**	**e-Value Uniprot**	**pI**	**MM**
199	93	Adenina Fosforibosiltransferase	APRT	42	B6U1A1	*Zea mays*	4.0×10-9	6,453	29673
36	97	Fenilalanina amônia-liase	PAL	382	Q8VXG7	*Z. mays*	7.0×10-20	6,045	86003
195	92	Flavoproteína wrbA	wrbA	163	B6U724	*Z. mays*	1.0×10-14	5,865	29836
157	63	Frutoquinase-2	Frk 2	270	Q6XZ78	*Z. mays*	1.0×10-9	5,56627	32155
100	76	Frutose bifosfato aldolase	FBA	171	P08440	*Z. mays*	9.0×10-14	7,880	43350
98	75	Frutose bifosfato aldolase	FBA	444	P08440	*Z. mays*	1.0×10-17	8,024	43815
102	102	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	GAPDH	571	Q9SAJ6	*Arabidopsis thaliana*	3.0×10-7	5,746	39501
93	73	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase, citossólica	GAPDH	747	Q0J8A4	*Oryza sativa subsp. Japonica*	2.0×10-15	7,013	44011
121	74	Glutamina sintetase	GS	283	Q9ZS52	*Pinus sylvestris*	5.0×10-8	6,096	38963
98	100	Glutamina sintetase	GS	438	Q9XFJ2	*Mesembryanthemum crystallinum*	2.0×10-17	5,632	40662
32	126	Metionina sintase	MetS	46	Q9M619	*Coffea arabica*	2.0×10-7	6,072	71896
17	80	Metionina sintase	MetS	213	Q8W529	*Z. mays*	6.0×10-11	5,67949	83432
247	112	Proteína predita	PP	160	B6TLQ6	*Z. mays*	2.0×10-7	4,651	19292
159	64	Proteína predita Sb01g036580	Sb01g036580	271	C5X1Q1	*Sorghum bicolor*	3.0×10-10	5,699	31813
220	62	Proteína predita Sb01g038760	Sb01g038760	392	C5WNL8	*S. bicolor*	2.0×10-8	6,2048	22827
190	61	Proteína predita Sb02g033760	Sb02g033760	155	C5X978	*S. bicolor*	8.0×10-17	6,038	25389
340	88	Proteína relacionada à patogênese 10a	PR-10	64	Q4VQB5	*S. bicolor*	6.0×10-4	5,341	16455
61	44	S - adenosilmetionina sintetase	SAMS3	379	Q9LGU6	*O. sativa subsp. Japonica*	3.0×10-13	5,569	47910
14	81	Sacarose sintase	SS2	275	Q9LKR0	*Saccharum officinarum*	6.0×10-9	5,949	90717
194	94	Superóxido dismutase	SOD	128	Q6QGY4	*Citrullus lanatus*	7.0×10-7	5,757	23173
222	90	Superóxido dismutase [Cu-Zn]	(Cu-Zn SOD)	59	Q9ZNQ4	*Cicer arietinum*	2.0×10-10	5,520	22308
130	66	YLP	YLP	160	Q9ZR97	*Hordeum vulgare*	2.0×10-4	7,077	37256

Tabela 9. Peptídeos diferencialmente expressos conforme sua presença (+) ou ausência (-) em raiz de cana-de-açúcar da variedade RB855536 (sensível) em condições de salinidade.

Anotação	0 mM	200 mM (2 h)	200 mM (72 h)	Razão %vol	Anova
APRT	-	-	+	-	0,008
PAL	-	-	+	-	0,019
wrbA		+	+	-	0,0003
Frk 2	+	-	+	-	0,004
FBA	+	-	+	-	0,005
FBA	+	+	-	-	0,004
GAPDH	-	+	-	-	0,00001
GAPDH	+	-	+	-	0,003
GS	+	-	+	-	0,051
GS	+	+	-	-	0,005
MetS	+	-	-	-	0,004
MetS	+	-	+	-	0,0008
PP	+	+	-	-	0,001
Sb01g036580	+	-	+	-	0,005
Sb01g038760	+	-	+	-	0,002
Sb02g033760	+	-	+	-	0,005
PR-10	-	-	+	-	0,035
SAMS3	+	+	-	3,764	0,007
SS2	+	-	+	-	0,008
SOD	-	+	+	-	0,006
(Cu-Zn SOD)	-	+	+	-	0,002
YLP	+	-	+	-	0,004

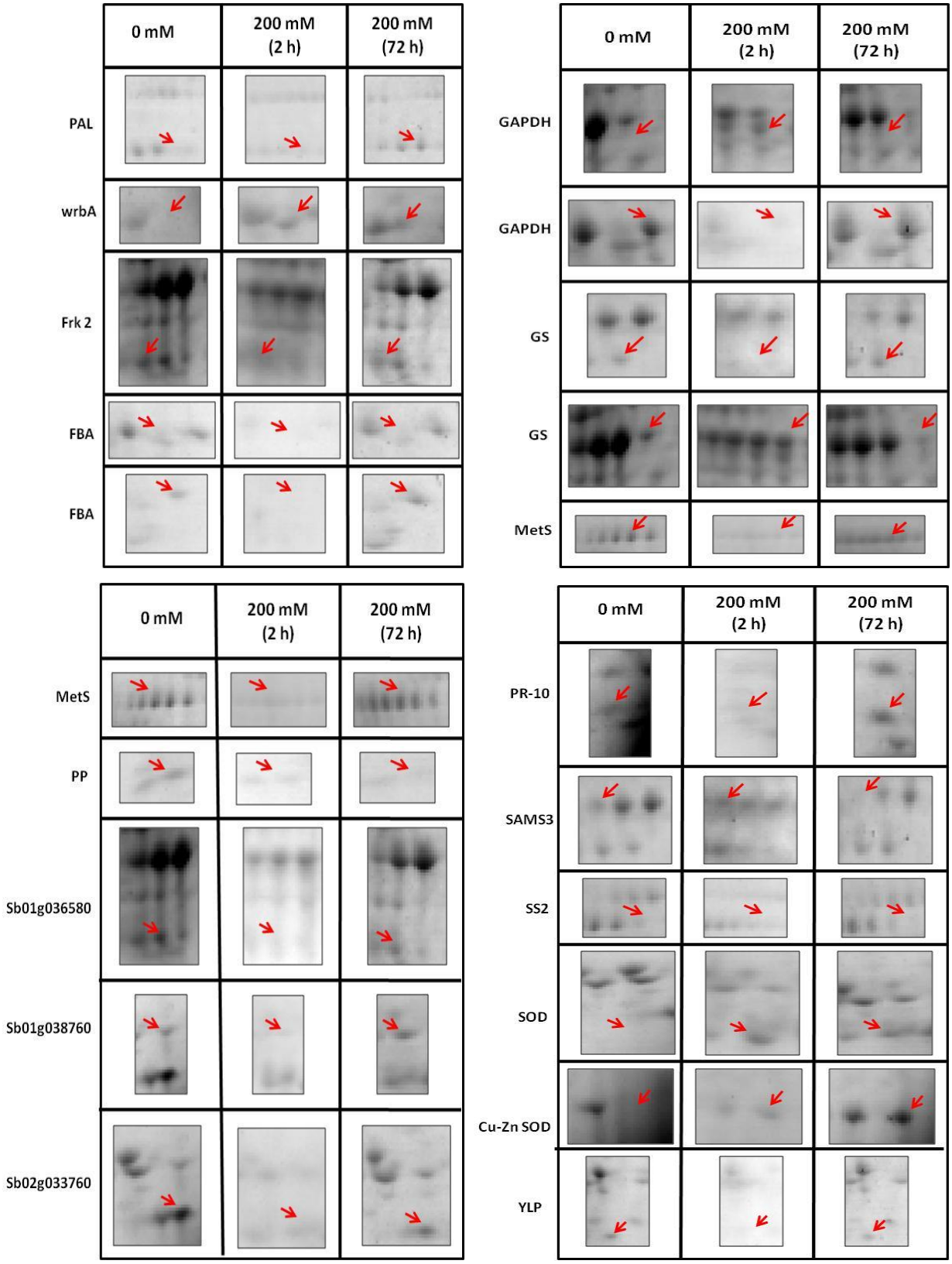


Figura 21. Representação de 21 *spots* dos 22 *spots* diferencialmente expressos em géis de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB855536 (sensível) em condições de salinidade cultivadas em casa de vegetação.

Da mesma forma da variedade tolerante, a sensível também apresentou variação nos níveis de expressão de peptídeos sob salinidade (**Figura 22**).

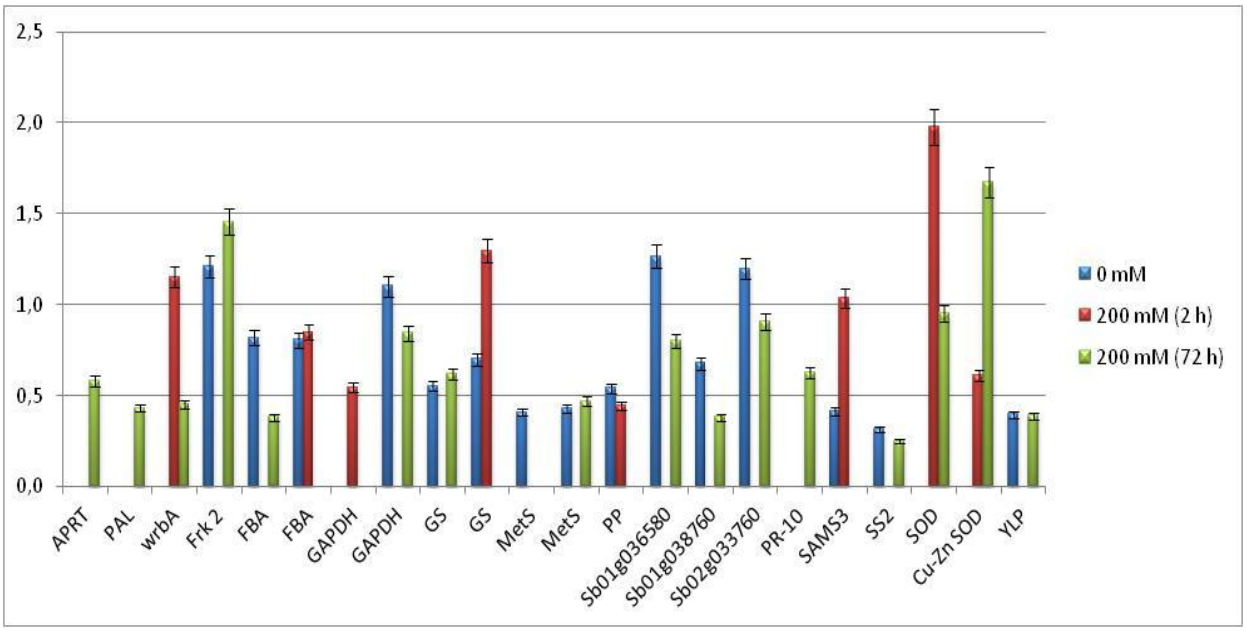


Figura 22. Porcentagem de volume dos peptídeos diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB855536 sob estresse por 200 mM de NaCl (após 2 h e 72 h) cultivadas em casa de vegetação.

Assim como a variedade tolerante (RB867515), a sensível (RB855536) apresentou proteínas com expressão induzidas em plantas em condições salinas, foram elas: a APRT, PR-10, WrbA, Cu-Zn SOD, PAL, SOD e a GAPDH. No entanto, a WrbA e a SOD foram mais expressas após 2 h de estresse salino e a Cu-Zn SOD mais expressa após 72 h. Já a APRT, PR-10 e a PAL foram exclusivas da condição após 72 h de estresse por 200 mM de NaCl. A GAPDH foi exclusiva da condição após 2 h de salinidade, porém também foi encontrada totalmente inibida em plantas nessa mesma condição e com expressão reduzida após 72 h.

Dentre os peptídeos diferencialmente expressos comuns à condição salina e controle foram encontrados a PP, MetS, Frk 2, SAMS3, SS2, Sb01g038760, Sb01g036580, Sb02g033760, YLP e os dois GS e FBA. No entanto, a PP reduziu a sua expressão após 2 h de estresse e foi inibida após 72 h. A SAMS3 e uma das GS e FBA tiveram sua expressão induzida após 2 h de salinidade e também foram inibidas após 72 h. A MetS, Frk 2, SS2, Sb01g038760, Sb01g036580, Sb02g033760 e a outra GS somente foram inibidas após 2 h de estresse, mas após 72 h a GS e a Frk 2 tiveram sua expressão aumentada em relação à condição controle e as demais apresentaram redução na sua expressão.

Apenas um dos MetS foi inibido em plantas estressadas por sal, sendo exclusivas apenas da condição controle (0 mM de NaCl).

RB867515 x RB855536

Na comparação realizada entre variedades dentro do mesmo tratamento foi verificada expressão diferencial de peptídeos após 2 h de exposição ao estresse por 200 mM de NaCl com razão de %vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05 (**Tabela 10**). Dentre os 24 *spots* selecionados, foi possível a identificação de sete peptídeos.

As isoformas da gliceraldeído desidrogenase 3 fosfato, citossólica (GAPDH) foram encontradas com expressão induzida em ambas as variedades estudadas. A proteína S - adenosilmetionina sintetase (SAMS3) foi induzida na variedade sensível (RB855536), enquanto que a fenilalanina amônia-liase, metionina sintase e a proteína de ciclo de divisão celular 48 foram exclusivas da variedade tolerante (RB867515).

Tabela 10. Anotação dos peptídeos diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da comparação RB867515 (tolerante) x RB855536 (sensível) em condições de salinidade após 2 h de exposição ao estresse.

Macth ID	**Anotação**	***Score***	**pI**	**MM**	**Razão % Vol**	**Anova**	**%Vol**	
							RB867515	**RB855536**
39	Gliceraldeído desidrogenase 3 fosfato, citossólica (GAPDH)	478	7,225	41495	5,709	0,002	1,29	0,34
47	S - adenosilmetionina sintetase (SAMS3)	379	5,569	47910	1,816	0,006	0,52	0,95
75	Gliceraldeído desidrogenase 3 fosfato, citossólica (GAPDH)	62	6,332	38888	-	0,003	-	1,88
132	Fenilalanina amônia-liase (PAL)	53	6,563	74206	-	0,007	0,31	-
139	Fenilalanina amônia-liase (PAL)	55	6,825	74206	-	0,006	0,20	-
143	Metionina sintase (MetS)	85	5,809	86489	-	0,0004	0,39	-
145	Proteína de ciclo de divisão celular 48 (CDC48)	243	5,438	90717	-	0,005	0,76	-

Após 72 h de exposição ao estresse salino as variedades de cana-de-açúcar também apresentaram nível de expressão de peptídeos diferentes com razão de %vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05. Dentre os 17 *spots* selecionados foi possível a identificação de dois peptídeos (**Tabela 11**).

Tabela 11. Anotação dos peptídeos diferencialmente expressos de raiz de cana-de-açúcar da comparação RB867515 (tolerante) x RB855536 (sensível) em condições de salinidade após 72 h de exposição ao estresse.

Macth ID	**Anotação**	***Score***	**pI**	**MM**	**%Vol**	
					RB867515	**RB855536**
109	Fator de depolimerização de actina 3 (ADF 3)	113	5,292	17816	0,39	-
137	Proteína predita Sb01g036580	279	6,947	38056	0,32	-

Tanto o fator o ADF3 quanto uma das isoformas encontradas da proteína predita Sb01g036580 foram exclusivos da variedade RB867515 (tolerante).

5.3 VALIDAÇÕES EXPERIMENTAIS

5.3.1 Validação por bioensaio

5.3.1.1 Superóxido dismutase (SOD)

Foram verificadas diferenças significativas na atividade da superóxido dismutase entre condições salinas e variedades. Na análise entre condições salinas, ambas as variedades apresentaram aumento da atividade da SOD após 2 h de exposição ao estresse salino. Porém um aumento mais acentuado foi observado na variedade tolerante (RB867515). Após 72 h a atividade da SOD reduziu em ambas as variedades sob estresse (**Figura 23**).

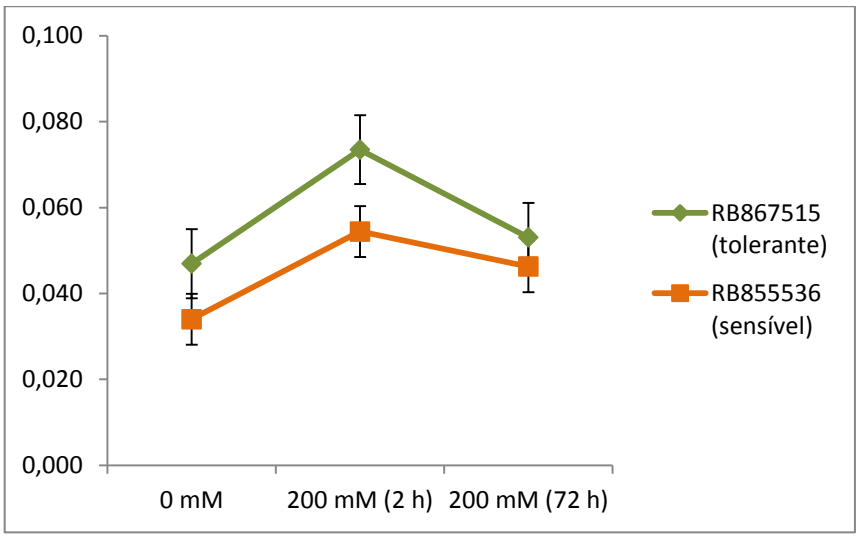


Figura 23. Atividade da superóxido dismutase em raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) sob estresse por 200 mM de NaCl cultivadas em casa de vegetação.

Quando realizada uma comparação dentre as variedades, foi verificada uma diferença significativa após 2 h de estresse salino, onde a variedade tolerante (RB867515) apresentou maiores valores da atividade da SOD em relação à variedade sensível.

Além da superóxido dismutase, a ascorbato peroxidase, peroxidase, fenilalanina amônia-liase e a metionina sintase que foram selecionadas como potencialmente associadas à resposta ao estresse salino, também estão sendo validadas através da determinação da atividade enzimática.

6 DISCUSSÃO

Seleção das variedades de cana-de-açúcar para análise proteômica

A variedade RB867515 foi selecionada como mais tolerante a salinidade, pois a RB92579, para tolerar o estresse por sal, realizou mecanismos de defesa com alta demanda energética, como fechamento quase total dos estômatos, reduzindo transpiração e a fotossíntese. Esses mecanismos podem ter levado a possível finalidade de manter o status hídrico nas células, conforme verificado nos resultados do potencial hídrico foliar e teor relativo de água. Além disso, a RB92579, juntamente com a RB855536, apresentou o maior percentual de vazamento de eletrólitos mostrando uma possível deficiência dessas variedades em compartimentalizar os íons nos vacúolos celulares. Portanto, a variedade RB855536 foi selecionada como mais sensível à salinidade dentre as variedades sensíveis a seca.

Xu et al. (2010) analisando perfis de proteínas sensíveis ao sal nas folhas e raízes de duas cultivares de grama rasteira (*Agrostis stolonifera* L.) diferentes na tolerância à salinidade observaram que com 28 dias sob condições de salinidade, percentuais do TRA e vazamento de eletrólitos diminuem e aumentam respectivamente corroborando com o presente trabalho, apresentando a cultivar Penn A4 mais tolerante por apresentar significativamente maiores percentuais no conteúdo relativo de água foliar e menor percentual de vazamento de eletrólitos em relação a cultivar Penncross sob estresse salino.

Extração, quantificação, integridade das proteínas, gel 2D PAGE e análise das imagens dos géis

A extração de proteínas de folha e raiz das variedades de cana-de-açúcar indicadas anteriormente como mais tolerante ou mais sensível ao NaCl pelo método fenólico apresentou-se eficiente, pois conseguiu extrair quantidade satisfatória de proteínas em todos os tratamentos analisados para posterior análise 2D. Esse método permite recuperação eficiente de proteínas e remove componentes não proteicos no caso dos tecidos vegetais ricos em compostos de polissacarídeos, lipídios e compostos fenólicos (FAUROBERT et al., 2007). Além disso, ele já se mostrou o mais eficiente tanto

quantitativamente quanto qualitativamente ao extrair proteínas de folha e colmo de cana-de-açúcar quando comparado com outros protocolos existentes na literatura para plantas (AMALRAJ et al., 2010). Sendo assim, esse método de extração de proteínas pode ser considerado também de alta eficiência para outros órgãos da mesma espécie.

O método de Bradford para quantificação de proteínas solúveis totais é o mais adequado para extração de proteínas de plantas pelo método fenólico já que os outros métodos para estimar a quantidade de proteínas baseiam-se na quantificação de compostos fenólicos (FAUROBERT et al., 2007).

Em relação à análise quantitativa dos *spots* de raiz em comparação com folha, em geral, foram encontrados poucos *spots* totais por gel, e isso pode ser devido à dificuldade encontrada em se extrair proteínas de raiz em comparação a outros órgãos da planta, pois a maior dificuldade para obter uma análise bem sucedida de proteomas de raiz está presente nas características do próprio órgão como: baixa quantidade relativa de proteínas e alta concentração de substâncias que interferem em sua separação na eletroforese bidimensional (MEHTA et al., 2008).

Um resultado importante pôde ser visto quando se comparou as variedades sob o mesmo tratamento, pois após 2 h de estresse por 200 mM NaCl, a variedade tolerante (RB867515) aumentou seu número total de *spots* enquanto que a variedade sensível (RB855536) mostrou o inverso. Nas comparações realizadas pelo programa Image Master 2D Platinum v7.05 (GE Life Sciences), apenas quando se comparou as variedades de cana-de-açúcar sob o tratamento de 200 mM NaCl (após 2 h de estresse) foi encontrado um número maior de *spots* exclusivos em relação aos número de *spots* comuns, o que poderia ser esperado já que as variedades apresentaram um comportamento inverso em relação ao número totais de *spots*. Esse mecanismo pode ser devido ao acúmulo de proteínas que podem conferir tolerância à salinidade na fase inicial da exposição, podendo ser essencial para tolerância por um longo período de tempo.

Identificação e anotação presumível dos peptídeos diferencialmente expressos em condições de salinidade

Os peptídeos anotados tiveram sempre correlação com respostas a estresses ambientais. Os fatores de depolimerização de actina (ADFs) nas plantas, por exemplo, são proteínas que se ligam a actina e regulam os filamentos de actina do citoesqueleto

modulando-os assim que estas sentem mudanças ambientais, através de várias atividades bioquímicas (HUSSEY; KETELAAR; DEEKS, 2006). A actina desempenha um papel muito importante na formação de raízes (THOMAS; SCHIEFELBEIN, 2002) e até mesmo já foi relacionada com aclimatação ao estresse por frio (OUELLET et al., 2001). A sua expressão induzida na raiz da variedade tolerante após 2 h de exposição ao estresse por sal pode significar que a planta mesmo sob estresse continua o crescimento de suas raízes, buscando encontrar regiões livres do excesso de sal, além de poder estar associada também à estruturação da parede celular para evitar a perda de água em meio hiperosmótico.

A proteína Ribossomal L12 (RPL12) em uma abordagem proteômica pode ser categorizada em proteína de tradução por estar envolvida na etapa de iniciação da tradução. Sob condições de salinidade, diversas proteínas ribossomais são encontradas com menor acúmulo sob estresse, como foi visto em raízes de *Arabidopsis* (JIANG et al., 2007). Porém quando se comparou a *Arabidopsis* (glicófita) com uma planta halófita, essa última apresentou maior acúmulo de proteínas envolvidas em biossíntese de proteínas (KOSOVÁ et al., 2011). O fato da RPL12 ter sido expressa apenas sob salinidade na variedade tolerante (RB867515) pode indicar que a mesma pode estar associada a biossíntese de proteína de novo indicando ser mais tolerante ao sal, para que as proteínas que foram degradadas, se a salinidade estiver levando a degradação de proteínas, possam ser supridas.

A fenilalanina amônia-liase (PAL) foi induzida em ambas as variedades em condições de estresse por 200 mM de NaCl, porém na variedade tolerante (RB867515), a mesma foi induzida após 2 h e na sensível após 72 h de estresse. A PAL é precursora de vários metabólitos secundários, inclusive os flavonoides que pode ser considerado como um antioxidante, já que estabilizam radicais livres e espécies reativas de oxigênio (VILA, 2006). Essa proteína pode ser essencial para mecanismo de tolerância ao sal em uma resposta inicial à exposição, bloqueando a formação de radicais livres permitindo com que a planta não sofra também por estresse oxidativo advindo da salinidade dos solos. Além disso, seu acúmulo tem sido correlacionado na literatura com estresses bióticos e abióticos (GAO et al., 2011). O aumento da sua atividade também está relacionado com síntese de lignina, o que poderia permitir o aumento na resistência das paredes celulares à ação de enzimas degradadoras, além de fornecer rigidez e espessamento (MARTINS-MIRANDA et al., 2006) para não haver perda de água na fase inicial ao estresse na variedade tolerante.

Foi verificada diferença de expressão da metionina sintase (MetS) entre as variedades em condições de salinidade. Essa enzima participa diretamente da via de biossíntese das poliaminas que tem concentração aumentada em respostas a estresses ambientais como seca e salinidade (OGAWA; MITSUYA, 2011). A variedade tolerante (RB867515) expressou a metionina sintase apenas em plantas expostas ao estresse com maior intensidade após 2 h de exposição ao NaCl, o que pode está relacionado ao efeito da concentração de poliaminas, que atrasa a degradação de proteínas e estabiliza as membranas do tilacóides (NARITA et al., 2004). Esse resultado pode ser correlacionado com os resultados fisiológicos obtidos no vazamento de eletrólitos dessa variedade nessa condição, pois foi a que apresentou menor percentual entre as variedades estudadas e não foram verificadas diferenças significativas entre as condições salinas. Além disso, foi verificado também que nessa condição a variedade tolerante foi a que apresentou maior quantidade de proteínas, tanto pelo método de Bradford e visualização da integridade por meio da corrida do gel SDS-PAGE quanto pela detecção de *spots* nos géis 2D, mostrando o efeito de atraso de degradação de proteínas. A variedade sensível (RB855536) parece não ter dado preferência a essa via, já que foi encontrada como exclusiva da condição controle, ou começou a expressá-la tardiamente quando foi encontrada uma MetS induzida somente após 72 h de exposição ao estresse por sal. Em estudos de análise proteômica com capim rasteiro (*A. stolonifera* L.) essa enzima também foi encontrada com expressão reduzida em folhas sob estresse salino na variedade sensível ao sal (XU et al., 2010).

As proteínas 14-3-3 são fosfoproteínas que regulam as atividades de alvos diretos da via de interação proteína-proteína (BRIDGES; MOORHEAD, 2004) e em plantas têm função reguladora de H^+- ATPase da membrana plasmática e da atividade de canais iônicos (PALMGREN, 2001; BUNNEY; VAN DEN WIJNGAARD; DE BOER, 2002). Essa proteína se liga a uma série de fatores de transcrição e outras proteínas de sinalização, e têm um papel importante na regulação do desenvolvimento da planta e resposta ao estresse abiótico por interagir com transportadores de íons, como os canais de potássio, além de interagir com APX e ABA, que desempenham papéis importantes nas respostas de estresse salino (XU; SHI, 2006). O resultado observado de inibição dessa proteína em plantas da variedade tolerante (RB867515) pode indicar uma supressão do transporte de íons tóxicos para dentro das células. Em estudo na alteração de proteoma da membrana plasmática de raízes de arroz sob estresse salino essa proteína também se apresentou de forma reprimida na variedade tolerante ao sal acompanhada de redução da expressão das H^+- ATPase (CHENG et al., 2009).

A fosfoglicerato quinase (PGK), que apresenta forma tanto cloroplastidial como citosólica, é uma enzima chave para a formação de piruvato na glicólise (DENNIS; BLAKELEY, 2000) e mesmo não apresentando expressão diferencial em relação ao tratamento controle na variedade tolerante foi expressa somente após 2 h de estresse salino e inibida após 72 h. Em folhas de arroz sob estresse por 50 mM de NaCl, essa proteína também foi responsiva apenas a curto prazo, após 24 h de exposição ao estresse (PARKER et al., 2006). Essa enzima geralmente é encontrada com redução na sua expressão em plantas sob estresse salino (KOSOVÁ et al., 2011), porém seu acúmulo pode indicar que a variedade tolerante ao sal não parou de assimilar carbono na fase inicial ao estresse que poderá servir de reserva para uma exposição em longo prazo.

As proteínas relacionadas com resposta à defesa contra fatores bióticos, como a PR-10, não são específicas de percepção de plantas a patógenos, mas também em condições de estresses abióticos, como seca, sal, frio, exposição à UV e metais pesados com maior acúmulo dessa proteína em plantas em condições adversas (JELLOULI et al., 2008). Assim como em raízes de arroz sob estresse salino (HASHIMOTO et al., 2004) em raiz de cana-de-açúcar de ambas as variedades, tolerante e sensível, a expressão da PR-10 foi induzida em plantas estressadas por altas concentrações de NaCl após 72 h de exposição, o que indica um papel de defesa geral contra os efeitos do sal na planta, pois ainda não se sabe ao certo sua relação direta com a resposta à salinidade.

O aumento na expressão da CDC48 na variedade tolerante (RB867515) após 2 h de exposição ao sal pode indicar que, mesmo sob estresse salino a planta nessa condição tende a continuar o crescimento das raízes já que essa proteína está envolvida na divisão e expansão celular e em processos de crescimento de órgão como raízes em plantas de crescimento rápido (PARK; RANCOUR; BEDNAREK, 2008).

Com nível de expressão contrastante nas variedades estudadas, aumento no acúmulo em dois *spots* na tolerante e redução na sensível, o peptídeo Sb01g036580 parece desempenhar um papel importante na tolerância ao sal, porém o banco de dados público do Uniprot (http://www.uniprot.org/) que foi utilizado para a anotação dos peptídeos não foi apresentado nenhuma ontologia gênica para essa proteína. Já para a Sb01g033060, o Uniprot apresenta que esse peptídeo está classificado dentro do processo biológico para metabolismo de sacarose associado ao processo de biossíntese, podendo indicar que a variedade tolerante (RB867515) sob salinidade inibe a biossíntese de sacarose após 2 h de exposição ao estresse e apresenta redução após 72 h em relação à condição controle (0 mM). O acúmulo de sacarose pode servir como osmólito compatível em plantas submetidas a estresses por salinidade (MARCONDES; GARCIA,

2009). Isso pode levar à intuição de que a variedade tolerante ao sal não ativa preferencialmente essa via como resposta inicial ao estresse.

A superóxido dismutase (SOD) foi verificada em ambas as variedades com expressão diferencial em plantas sob estresse salino. As duas classes da SOD foram encontradas em resposta à salinidade: a Mn-SOD com expressão reduzida sob condições salinas na variedade tolerante (RB867515) e a Cu-Zn SOD com expressão induzida na sensível (RB855536). A SOD é uma enzima que constitui a primeira linha de defesa contra as EROs, e cada uma de suas formas apresentam papel chave na resposta ao estresse salino (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). A atividade dessa enzima aumentada em cana-de-açúcar está relacionada com tolerância ao estresse por sal (MEDEIROS et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010b; WILLADINO et al., 2011), além do sistema de defesa antioxidante ativado por processos não enzimáticos, como a produção de poliaminas e flavonoides (BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNYK, 2000), que provavelmente também foi ativada pela variedade tolerante após 2 h de estresse. Entretanto, na variedade sensível, possivelmente a primeira via de resposta antioxidante foi pelo processo enzimático, através da superexpressão da SOD para reduzir as ERO, entretanto a atividade desta enzima foi baixa resultando em um sistema ineficaz.

A enzima triose fosfato isomerase (TPI), que converte a dihidroxiacetona em gliceraldeído-3-fosfato reversívelmente, foi exclusiva da condição de salinidade após 2 h de estresse na variedade tolerante (RB867515), podendo indicar um aumento na via glicolítica nessa condição, podendo estar relacionada com um aumento da respiração nas raízes na fase inicial ao estresse, já que esse processo é uma fonte de produção de energia para o crescimento e manutenção de processos celulares, principalmente em condições de estresse ambiental. Em estudos com café submetidos a déficit hídrico, houve uma redução dessa enzima em condições de seca (SOARES, 2008), sugerindo o deslocamento desse intermediário para outras vias. Já em folhas de trigo sob estresse salino, houve acúmulo diferencial aumentada da triose fosfato isomerase (GAO et al., 2011), sugerindo que o aumento da regulação da quebra da glicose poderia ser em parte devido à necessidade de energia extra para a desintoxicação e reparação de danos causados por moléculas oxidativas.

A biossíntese de ATP foi induzida em plantas da variedade tolerante (RB867515) após 2 h de exposição ao sal e após 72 h voltou a se expressar como as plantas sem sal. Esse processo pode ser visualizado através da expressão da enzima ATP sintase subunidade alfa indicando fornecimento de energia para a planta na fase inicial de estresse. A ATPA foi verificada em vários estudos proteômicos com aumento na sua

expressão em genótipos tolerante de cevada (ZHANG et al., 2004) e relacionado com adaptação ao estresse salino em trigo (WANG et al., 2008) e arroz (KIM, D. et al., 2005). Além disso, na análise proteômica de *Aeluropus lagopoides*, planta halófita da família *Poaceae*, a ATP sintase também foi altamente induzida sob estresse salino (SOBHANIAN et al., 2010).

Foram encontrados padrões distintos da gliceraldeído desidrogenase 3 fosfato (GAPDH). A mesma foi induzida em ambas as variedades por salinidade após 2 h, só que para a variedade sensível (RB855536) foram encontradas duas GAPDH, sendo que uma foi exclusiva de 2 h de exposição e a outra inibida nessa mesma condição. Assim como a TPI, essa enzima participa da glicólise e seu acúmulo pode indicar manuntenção da atividade glicolítica, principalmente na fase inicial de exposição ao estresse salino. Gupta e Kaur (2005) relataram que as isorformas podem ser induzidas ou reprimidas em plantas sob estresses abióticos. Em raízes de pepino (DU et al., 2010), essa enzima também se mostrou induzida sob estresse salino.

A glutamina sintetase (GS) é uma enzima essencial na produção de prolina, um soluto compatível que pode exercer papel diretamente na proteção de proteínas contra a desnaturação causadas pelo excesso de sais (BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNYK, 2000). Dentre as duas isoformas encontradas na literatura para plantas a GS1, situada no citosol é a mais encontrada em raízes. Duas isoformas dessa proteína foram encontradas na raiz de plantas da variedade sensível ao sal, onde uma das isoformas aumentou sua expressão após 2 h de exposição ao estresse e a outra foi inibida nessa mesma condição, porém induzida após 72 h. Dependendo do órgão em estudo e da isoforma encontrada a GS pode ser induzida ou inibida em estresse por sal. Em raiz de arroz submetida a estresse salino, essa enzima apresentou expressão reduzida (YAN et al. 2005), porém em folha foram encontradas com expressão induzida na variedade tolerante e reprimida na variedade sensível ao sal (SAHU; SAHOO; SAHOO, 2001). O fato dessa proteína se expressar mais após 2 h de exposição ao estresse por sal na variedade sensível (RB855536) pode indicar que esta acumula prolina como principal soluto compatível para ajustamento osmótico na fase inicial do estresse, porém esse resultado não pode ser considerado determinante de tolerância ao sal em raiz de cana-de-açúcar, já que existe variação na expressão de suas isoformas.

O aumento da atividade da S–adenosilmetionina sintetase (SAM) está correlacionado com uma maior deposição de lignina nos tecidos vasculares das plantas sob estresse salino. Além disso, o aumento da regulação das enzimas SAM pode afetar processos distintos, tais como a biossíntese de aminoácidos, poliaminas, compostos de

fenilpropanoides, e etileno (TIECHER, 2010). A SAM também é um doador universal de grupo metil para o DNA, proteínas, carboidratos, lipídios de membrana, flavonoides e outros (ROJE, 2006). Seu acúmulo associado com maior deposição de lignina foi verificado em estudos realizados com tomate em raízes de plantas sob estresse salino (SÁNCHEZ-AGUAYO et al., 2004). Aumento do seu acúmulo também foi verificado em raízes do genótipo de tomate sensível ao sal (MANAA et al., 2011). Já em raízes de plantas de cevada sob estresse salino, foi verificado aumento no acúmulo de SAMS em ambas as cultivares contrastantes na tolerância ao sal, porém um maior acúmulo foi visto na cultivar tolerante indicando que por favorecer o metabolismo da metionina poderia, então, promover um melhor desenvolvimento das plantas sob estresse salino. O seu acúmulo após 2 h de salinidade em raiz da variedade sensível e inibição após 72 h pode indicar que a planta envia sinal para começar a lignificação, cessando crescimento na fase inicial de exposição à salinidade. A planta, nessa condição, poderia ainda estar ativando a biossíntese de aminoácidos realizando uma importante função no ajuste osmótico nas raízes sob estresse salino, protegendo enzimas e membranas. Além disso, poderia estar ativando a via de sinalização de etileno que promove a senescência e morte celular e modula a resposta ao sal em diferentes níveis, incluindo receptores de membrana, componentes no citoplasma e fatores de transcrição nucleares na via, porém sua relação com a tolerância e sensibilidade à salinidade está sendo estudada para elucidar as vias reais de respostas (CAO; CHEN; ZHANG, 2008). O inverso é verificado na variedade tolerante que parece estimular o crescimento das raízes nessa condição.

A frutoquinase 2 que foi inibida após 2 h de estresse por NaCl e com expressão diferencial aumentada após 72 h pode indicar que as plantas da variedade sensível (RB855536) parece cessar o crescimento de raízes na fase inicial do estresse salino. Em estudos com mutante de tomates para essa enzima foi verificado uma inibição do crescimento de raízes (ODANAKA; BENNETT; KANAYAMA, 2002). Além disso, o aumento após 72 h de estresse pode indicar a regulação dessa proteína fornecendo substrato para a via glicolítica, nesse caso a hexose fosfato, indicando necessidade de crescimento da raiz para tolerância ao excesso de sais, porém mais tardio em comparação com variedade tolerante. Outra possibilidade seria que a variedade sensível pode tardiamente, através da Frk2, aumentar a quantidade de substrato para a síntese de sacarose para servir como função de osmólito compatível.

Dentre as proteínas preditas encontradas na variedade sensível, a Sb01g038760 e a Sb02g033760 apresentaram expressão inibida após 2 h de exposição e redução após 72 h em relação à condição controle.

A Sb01g038760 apresenta na sua classificação por ontologia gênica a atividade peroxidase, que tem por função catalisar a molécula de peróxido de hidrogênio, provenientes também como consequência da ação da SOD, em água (BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNYK, 2000). Em cultivares de cevada sob estresse salino, a APX (peroxidase ascorbato) também foi mais expressa em raízes do genótipo sensível em comparação ao tolerante (WITZEL et al., 2009). Sua inibição após 2 h de exposição ao estresse salino pode indicar o não acompanhamento da peroxidase com o aumento de expressão da SOD, o que indica que não está havendo remoção das H_2O_2 necessária para completa tolerância aos danos oxidativos causados pela salinidade. Além disso, embora tenha se expressado após 72 h foi menor quando comparado a SOD nessa mesma condição. Esse resultado pode indicar a suscetibilidade da variedade RB855536 mesmo com elevada expressão da SOD.

Para a Sb02g033760, no UNIPROT, apresenta um comentário na semelhança de sequência que essa proteína contém um domínio C2 que são domínios de regulação de cálcio amplamente encontrados na natureza. Segundo Silva e colaboradores (2011) é provável que muitas proteínas que contém o domínio C2 estejam envolvidas na detecção de sinais de estresses bióticos e abióticos nas plantas, na transdução como reguladores positivos ou negativos e na cascata de sinalização do estresse. O fato de ter sido inibida após 2 h sugere que a variedade sensível (RB855536) ativa mecanismos de tolerância via transdução de sinais mais tardiamente, já que após 72 h essa proteína aumenta sua expressão. Em estudo com a linhagem de arroz que apresentava a superexpressão do gene *Os*OMCP1, que codifica um proteína com domínio C2, foi verificada uma maior tolerância ao estresse salino e osmótico (YOKOTANI et al., 2009). Sob estresse abiótico o gene CaSRC2-1apresentou papel crítico em raízes de pimenta (KIM, Y. et al., 2008).

As flavoproteínas já foram ditas para melhorar a tolerância aos estresses abióticos em plantas. Em estudos com *Arabidopsis* com expressão induzida do gene *At*HAL3 que codifica uma flavoproteína permitiu maior crescimento e tolerância ao estresse por sal e osmótico (ESPINOSA-RUIZ et al., 1999). O aumento de indução dessa proteína na variedade sensível (RB855536) sob salinidade pode ser uma via para tolerar elevadas concentrações de sais na raiz. Em raízes de duas espécies de capim rasteiro (*A. stolonifera* L.), uma flavoproteína também foi induzida por estresse salino, porém o envolvimento direto na tolerância à salinidade ainda não é claro e garante uma análise mais aprofundada em estudos futuros (LIU et al., 2011).

A SS2, sacarose sintase 2, está relacionada com a degradação de sacarose que seria o principal substrato para a respiração celular, por isso está diretamente relacionada

com o crescimento e, obviamente, com a produtividade em açúcar. Na cana-de-açúcar, SS favorece a geração de UDPG de sacarose para a formação de material da parede celular e amido (VERMA et al., 2010). A variedade sensível (RB855536) apresentou redução de seu acúmulo em plantas submetidas a estresse salino, podendo indicar que não está havendo degradação da sacarose na fase inicial de exposição ao estresse, portanto, a via glicolítica pode está sendo reduzida em raiz. O inverso foi verificado na variedade tolerante, que apresentou maior acúmulo de enzimas que permitiam a via glicolítica ativada para fornecimento de energia e crescimento de raiz nessa fase. Em raiz de plantas de arroz sob estresse salino transcritos da SS2 foram reduzidos e permaneceram assim após 3 h sob estresse salino sugerindo que o metabolismo de carboidratos é alterado na fase inicial de exposição ao estresse (KAWASAKI et al., 2001).

A APRT (Adenina fosforibosiltransferase) é uma enzima chave que converte a adenina em adenosina monofosfato na via de salvamento da adenina. Além disso, pode também utilizar citocininas, uma classe de hormônios vegetais, como substratos que juntamente com a auxina regula vários aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo a divisão e expansão celular (ALLEN et al., 2002). Zhou e colaboradores (2006) relataram que estudos anteriores forneceram evidências sugerindo que o caminho da APRT é a via predominante para a recuperação de adenina em plantas sob condições de estresse. O fato de essa enzima ser exclusiva de plantas da variedade sensível (RB855536) sob salinidade após 72 h de exposição ao estresse sugere que mais uma vez essa variedade parece levar mais tempo para investir em crescimento e fornecimento de energia nas raízes quando comparada com a variedade tolerante (RB867515).

A proteína YLP é descrita na literatura como um tipo de H^+ ATPase que tem por função regular o antiporter Na^+/H^+ vacuolar e o aumento da sua atividade foi verificado em plantas sob estresse salino (CHENG et al., 2009; SILVA; GERÓS, 2009). Sua inibição após 2 h na variedade sensível ao sal pode sugerir a deficiência desta em transportar íons Na^+ para dentro dos vacúolos na fase inicial de exposição ao estresse, já que provavelmente a concentração Na^+ estava elevada causando inibição dessa proteína, porém após 72 h as plantas voltam a expressá-la proporcionando uma nova homeostase iônica. No entanto, a expressão dessa proteína após 72 h parece ter sido tarde já que essas plantas não mostraram mecanismos fisiológicos de tolerância à salinidade, principalmente quando relacionado com os resultados obtidos por vazamento de eletrólitos foliar que apresentou um aumento significativo nessa variedade.

A frutose bifosfato aldolase (FBA) converte a frutose 1,6 bifosfato em gliceraldeído 3 fosfato e dihidroxiacetona (BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNYK, 2000). Novamente a via glicolítica parece ter sido inibida após 2 h de salinidade na variedade sensível (RB855536), porém também foi verificado que essa proteína foi inibida após 72 h. Sugere-se que essa via parece ter ser ativada para fornecimento de energia, e que os açúcares disponíveis parecem servirem para reserva. As isoformas da FBA já foram relacionadas com estresses ambientais em plantas (REIS, 2009). Aumento da expressão da FBA em arroz tratados com sal foi visto e sugerido pelos autores Abbasi e Komatsu (2004) que sua expressão pode desempenhar um papel na aclimatação de mudas de arroz sob estresse salino. Além disso, a expressão da FBA em uma análise proteômica em plantas de mangue foi responsiva ao sal sugerindo que esta desempenha papel importante nos mecanismos de tolerância ao sal comum a plantas glicófitas e de mangues (TADA; KASHIMURA, 2009). Os mesmos autores, ainda relatam que o aumento na expressão de FBA aumentaria o fluxo de carbono através do ciclo de Calvin e levaria a um aumento de sacarose da glicólise, o que contribuiria para tolerância ao estresse por sal pela produção de osmólito compatível.

Modelo esquemático de mecanismos de resposta a salinidade em cana-de-açúcar

Com base nos resultados encontrados foi possível traçar modelos esquemáticos de tolerância ao estresse salino que resume tudo o que foi discutido anteriormente. Conforme visto, as proteínas envolvidas com crescimento, desenvolvimento, metabolismo de carboidratos e fornecimento de energia foram induzidas após 2 h de exposição à salinidade na variedade tolerante (RB867515) indicando que essas plantas em contato com o sal parecem ativar sinalização molecular e celular para a manutenção do crescimento radicular, resultando em maior absorção de água e nutrientes (**Figura 24**).

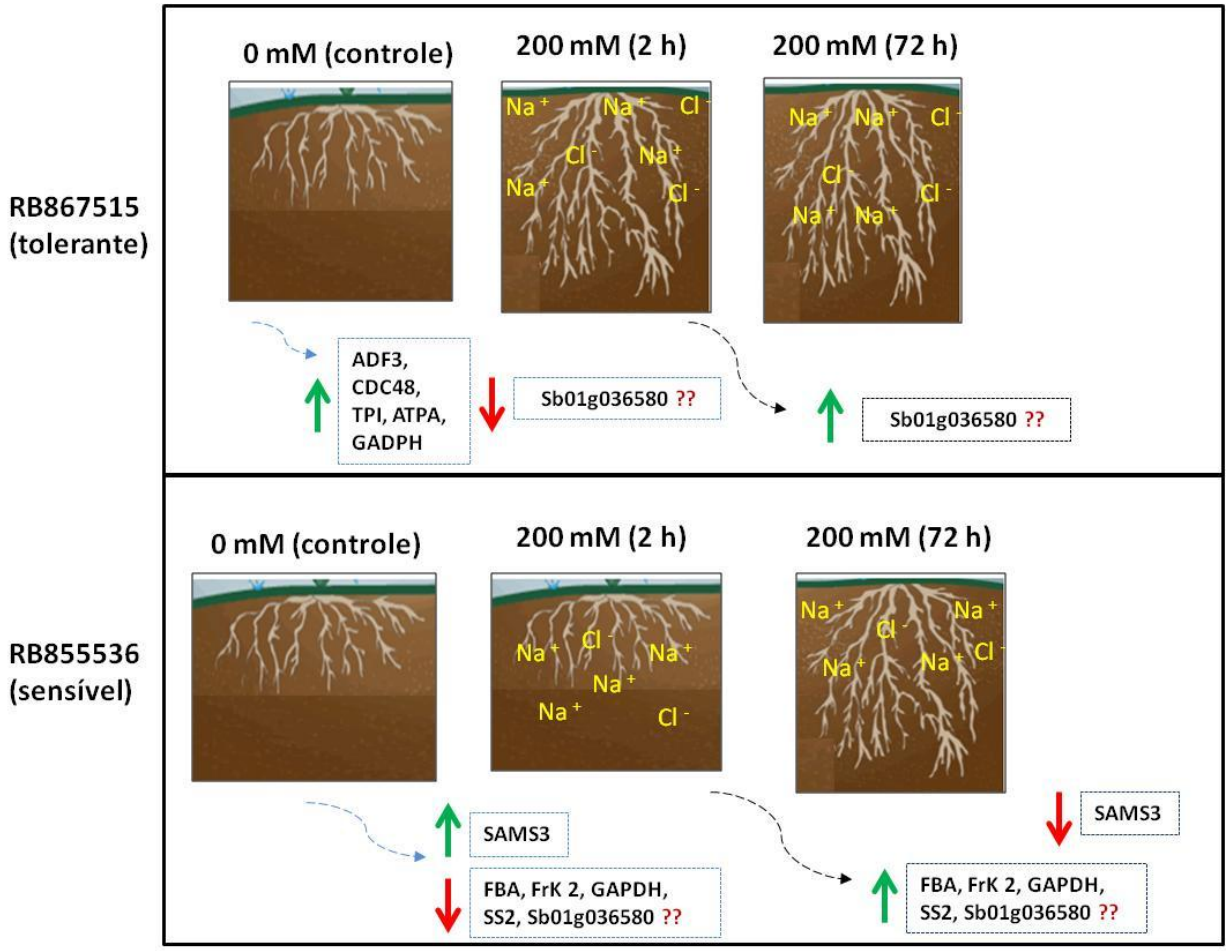


Figura 24. Representação esquemática da expressão de proteínas de raiz de cana-de-açúcar sob salinidade cultivada em casa de vegetação. Adaptado de fonte: http://anaejeni.blogspot.com/2010_11_01_archive.html.

Já a variedade sensível (RB855536) mostra um mecanismo inverso de ajuste ao estresse salino, no qual as plantas sensíveis parecem não investir em crescimento e desenvolvimento, mas em uma via de sinalização de lignificação (SAMS3) para tornar as raízes mais impermeáveis à solução salina, além dessa proteína levar a morte celular senescência. Após 72 h as plantas da variedade sensível expressam as proteínas envolvidas em crescimento que foram inibidas na fase inicial ao estresse, sugerindo que essas plantas respondem mais tarde ao estresse por sal da mesma forma que a variedade tolerante.

No entanto, essa via não parece ter sido a única a ser ativada tardiamente na resposta da variedade sensível ao estresse. Nela, foi identificada indução do sistema de defesa antioxidante por meio do aumento da expressão da enzima SOD após 2 h e 72 h de exposição ao estresse, porém não acompanhado do aumento das peroxidases (Sb01g038760) para remoção do peróxido de hidrogênio liberado pela SOD, o qual é

altamente tóxico em altas concentrações (**Figura 25**). Em adição, as plantas da variedade tolerante induzem a TPI que fornece energia extra para desintoxicação e reparo de danos causados por moléculas oxidativas, o que não foi verificado nas plantas da variedade sensível.

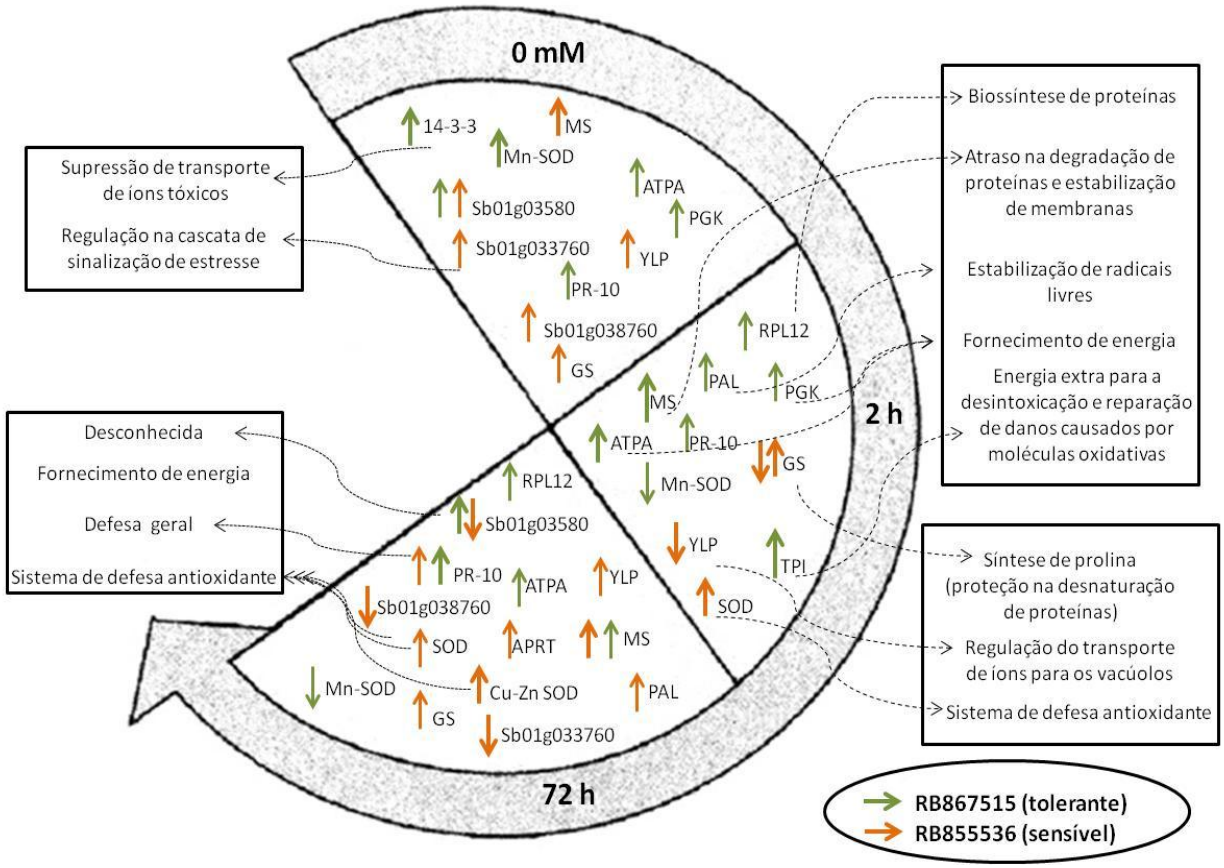


Figura 25. Representação esquemática temporal da expressão de proteínas de raiz de cana-de-açúcar sob salinidade cultivada em casa de vegetação. Setas verdes para cima: expressão induzida na proteína da variedade RB867515 (tolerante); setas verdes para baixo: expressão inibida na variedade RB867515 (tolerante); setas laranja para cima: expressão induzida da proteína na variedade RB855536 (sensível); setas laranja para baixo: expressão inibida na variedade RB855536 (sensível).

Após 2 e 72 h de estresse por 200 mM de NaCl a variedade tolerante (RB867515) expressa proteínas que participam da biossíntese de proteína, indicando reposição das que foram degradadas e regulam canais iônicos (14-3-3) para que haja supressão na entrada de íons tóxicos. Enquanto que a sensível parece investir em síntese de prolina para proteção contra a desnaturação de proteínas somente na fase inicial ao estresse. A forma inibida da YLP após 2 h de exposição ao estresse na variedade sensível (RB855536) adicionalmente indica a dificuldade de compartimentalização dos íons Na^+ em vacúolos e extrusão do Na^+ para o exterior da raiz na fase inicial ao estresse.

Além disso, a PAL e a MetS envolvidas na estabilização de radicais livres para evitar as EROs, atraso na degradação de proteínas e estabilização de membranas tiveram sua expressão induzida na fase inicial de exposição ao estresse na variedade tolerante (RB867515), enquanto que na sensível essas proteínas só foram expressas após 72 h de estresse sugerindo, então, que essa via é mais eficiente para conferir tolerância da cana-de-açúcar a salinidade dos solos.

Validação transcricional (RT-qPCR) e por bioensaio

A validação transcricional por RT-qPCR em andamento irá auxiliar a comprovar a correlação entre os genes codificantes das proteínas diferencialmente expressas encontradas e a resposta das plantas ao estresse salino, já que esse método é bastante adequado para a investigação das mudanças fisiológicas da planta baseadas nos padrões de expressão gênica (GACHON et al., 2004).

Para a validação por bioensaio, a partir dos dados de nível de expressão (%Vol) e da atividade da superóxido dismutase foi possível sugerir que as diferentes classes das SOD observadas podem ter respostas variadas de tolerância ao estresse salino. A Mn-SOD foi encontrada somente na variedade tolerante (RB867515) e mesmo reduzindo a expressão após 2 h de estresse foi observada alta atividade dessa enzima nessa condição, indicando que essa variedade apesar de ter apresentado acúmulo de SOD menor, porém torna-as ativas. Por outro lado, na variedade sensível não foi verificada diferença na expressão dessa classe da SOD (**Figura 26**).

O aumento no acúmulo da SOD e Cu-Zn SOD após 2 h de estresse na variedade sensível (RB855536) corrobora com o aumento da atividade dessas enzimas nessa condição, no entanto a redução da SOD após 72 h de exposição ao estresse pode estar reduzindo a atividade da SOD em geral, já que esta reduz a atividade nessa mesma condição.

Além disso, a Cu-Zn SOD torna-se inativa na presença de altas concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) o que explicaria a redução na atividade na variedade sensível. No entanto, não acorre o mesmo com a Mn-SOD, que continua ativa, pois altas concentrações de H_2O_2 não alteram sua atividade, por isso o aumento na variedade tolerante após 2 h de estresse (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). Em adição, outra explicação para discrepâncias entre o nível de expressão da SOD e a sua atividade, seria que essa enzima para se tornar ativa necessite de uma possível modificação pós-

traducional e as variedades diferiram nas classes de SOD mais ativa em resposta ao estresse salino.

As classes das enzimas SOD e Cu-Zn SOD, embora apresentando maior acúmulo na variedade sensível, a atividade não corresponde de forma eficiente. Sugere-se, então, que a atividade da classe da Mn-SOD, presente na variedade tolerante, está mais relacionada com tolerância à salinidade, já que sua atividade foi aumentada em plantas sob estresse salino.

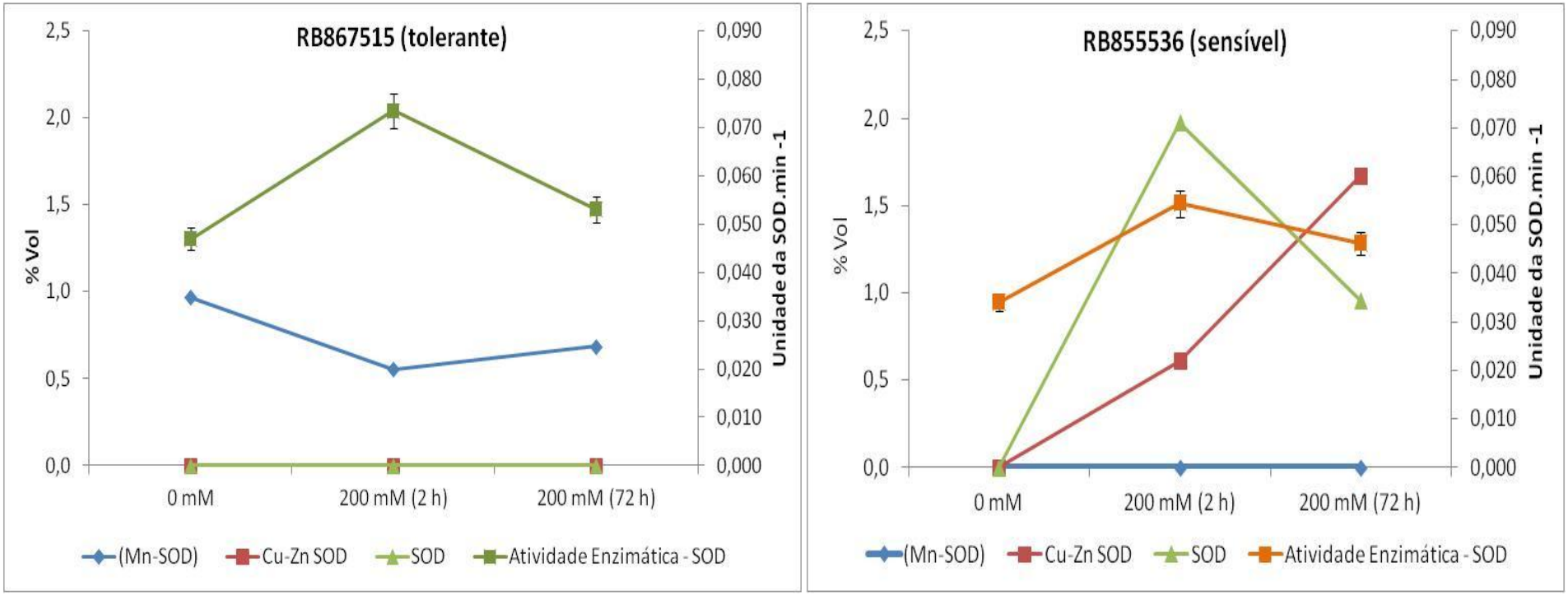


Figura 26. Nível de expressão das diferentes classes de SOD e atividade enzimática da superóxido dismutase (geral) em raiz de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) sob estresse por 200 mM de NaCl cultivadas em casa de vegetação.

7 CONCLUSÕES

A partir das variedades selecionadas como mais tolerante e mais sensível à salinidade através da análise dos parâmetros fisiológicos, foi possível identificar peptídeos diferencialmente expressos entre elas, indicando mecanismos de tolerância genótipo-específicos em cana-de-açúcar.

Em raízes, a anotação dos peptídeos diferencialmente expressos selecionados, em ambas as variedades, foi relacionada com resposta a estresse por sal, porém os resultados sugerem que a tolerância à salinidade pode estar mais associada à regulação temporal da resposta molecular e fisiológica, visto que as vias de respostas que conferiram tolerância na variedade RB867515 foram ativadas na fase inicial de exposição ao estresse (após 2 h) enquanto que na variedade sensível (RB855536) essas mesmas vias foram expressas após 72 h de estresse. Porém, além da questão temporal a ativação do sistema antioxidativo enzimático, a SOD em particular, reduz danos às membranas, proteínas e DNA. Apenas após a identificação dos peptídeos de folha, expressos diferencialmente em associação com resposta à salinidade, a variação do proteoma do órgão fotossintético poderá ser relacionada.

Os principais peptídeos relacionados com tolerância a salinidade, como a fenilalanina amônia-liase, metionina sintase, as reguladoras de antiportador (YLP) com expressão induzida, a Mn-SOD com maior expressão sob salinidade, e a proteína 14-3-3 com expressão reprimida, além das proteínas envolvidas com fornecimento de energia (TPI e APRT) são sugeridas como candidatas para marcadores moleculares de tolerância à salinidade, buscando auxiliar os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar.

8 REFERÊNCIAS

ABBASI F. M; KOMATSU S. A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. **Proteomics**. v.4, n.7, p. 2072-2081, Jul. 2004

AEBERSOLD R, MANN M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**. Review, v.422, n.6928, p.198-207, mar. 2003.

AHSAN, N. et al. Tissue-specific defense and thermo-adaptive mechanisms of soybean seedlings under heat stress revealed by proteomic approach. **Journal Proteome Research**. v.9, p.4189-4204, 2010.

ALI, G. M.; KOMATSU, S. Proteomic Analysis of Rice Leaf Sheath During Drought Stress. **Journal of Proteome Research**. v.5, n.2, p.396-403, jan. 2006.

ALLEN, M. et al. Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of *Arabidopsis* and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. **Physiology Plant**, v.115, n.1, p.56-68, may. 2002.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.372, p.1331-1341, may. 2002.

ALVES, F.A.L. et al. Mecanismos fisiológicos envolvidos com a diminuição de K^+ em raízes de cajueiro causada por NaCl. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.40, n.4, p.588-595, out./dez. 2009.

AMALRAJ, R.S. et al. Sugarcane proteomics: establishment of a protein extraction method for 2-DE in stalk tissues and initiation of sugarcane proteome reference map. **Electrophoresis**, v.31, n.12, p.1959-74, jun. 2010.

ANDRADE, A. et al. O proteoma da madeira. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n.36, p.10-17, 2006.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373-399, 2004.

APSE, M.P. et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na+/H+ antiport in *Arabidopsis*. **Science.** v.285, n.5431, p.1256-1258, aug. 1999.

AZEVEDO NETO, A.D.; GOMES FILHO, E.; PRISCO, J.T. Salinity and oxidative stress. In: KHAN, N.A.; SINGH, S. (ed.). **Abiotic stress and plant responses**. New Delhi: I.K. International, 2008. cap.4, p.57-82.

ASHRAF, M. et al. Amelioration of Salt Stress in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) by Supplying Potassium and Silicon in Hydroponics. **Pedosphere**, v.20, n.2, p. 153-162, apr. 2010.

BAGINSKY, S.; GRUISSEM, W. Arabidopsis thaliana proteomics: from proteome to genome. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.1485-1491, 2006.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.24, p. 23-58, 2005.

BARRS, H.D.; WEATHERLEY, P.E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. **Australian Journal of Biological Science**, v.15, n.3, p.413-428, 1962.

BERITOGNOLO, I. et al. Comparative study of transcriptional and physiological responses to salinity stress in two contrasting *Populus alba* L. genotypes. **Tree Physiology**. sep. 2011.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry**, v.7, n.72, p.248-254, may. 1976.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (ed.) **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiology, 2000. p.158-1203.

BRIDGES D.; MOORHEAD G.B.G. 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. **Science's**. STKE, 2004. p. 2421–2428.

BUNNEY, T.D.; VAN DEN WIJNGAARD, P.W.; DE BOER, A.H. 14-3-3 protein regulation of protons pumps and ion channels. **Molecular Plant Biology**, v.50, p.1041-1051, fev. 2002.

CALSA Jr. T. FIGUEIRA, A. Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C4 metabolism and putative antisense transcripts. **Plant Molecular Biology**, v. 63, n. 6, p.745-762, 2007.

CANABERO, F.J.; MARTINEZ, V.; CARVAJAL, M. Does calcium determine water uptake under saline conditions in pepper plants, or is it water flux, which determines calcium uptake. **Plant Sciences**, v.166, n.2, p.443-450, Feb. 2004.

CAO YR, CHEN SY, ZHANG JS. Ethylene signaling regulates salt stress response: an overview. **Plant signaling & behavior**, v.3, n.10, p.761-763, Oct. 2008.

CARILLO, P. et al. Salinity stress and salt tolerance. In: SHANKER, A.K.; VENKATESWARLU, B. **Abiotic stress in plants – Mechanisms and adaptations**. Rijeka, InTech, 2011, p.21-38.

CARUSO, G. et al. Analysis of drought responsive proteins in wheat (T*riticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. **Plant Science**, v.177, n.6, p.570–576, dec. 2009.

CASATI P. et al. Analysis of leaf proteome after UV-B irradiation in maize lines differing in sensitivity. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.4, n.11, p.1673-1685, nov. 2005. Epub jul. 2005.

CESNIK, R. Melhoramento da Cana-de-açúcar: marco sucro-alcooleiro no Brasil. In: Cesnik, R.; MIOQUE, J.Y.J. **Melhoramento da Cana-de-açúcar**. Brasília: EMBRAPA – Embrapa informações tecnológicas, 2004, 307p.

CHENG, Y. et al. New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress. **Proteomics**, v.9, n.11, p.3100-3114, jun. 2009.

CHINNUSAMY, V.; SCHUMAKER, K; ZHU, J.K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.225-236, 2004.

CIARMIELLO, L.F. et al. Plant genes for abiotic stress. In: SHANKER, A.K.; VENKATESWARLU, B. **Abiotic stress in plants – Mechanisms and adaptations**. Rijeka, InTech, 2011, p.283-308.

CIB. **Guia da cana-de-açúcar:** avanço científico beneficia o país. Conselho de informações sobre biotecnologia. 2009. Disponível em: <http://www.cib.org.br/pdf/guia_cana.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2010.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar: safra 2010/2011: primeiro levantamento (Abril/2010). Brasília, 2010. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3cana_de_acucar.pdf.>. Acesso em: 09 ago. 2010.

DENNIS D.T.; BLAKELEY S.D. Carbohydrate metabolism. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (ed.) **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiology, 2000. p. 630-675.

DU, C.X. et al. Proteomic analysis of cucumber seedling roots subjected to salt stress. **Phytochemistry**, v.71, n.13, p.1450-1459, jun. 2010.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Editora Planta, 2006. 403p.

ESPINOSA-RUIZ, A. et al. *Arabidopsis thaliana* AtHAL3: a flavoprotein related to salt and osmotic tolerance and plant growth. **Plant Journal**, v.20, n.5, p.529-539, dec. 1999.

FAGERIA, N. K. et al. Melhoramento genético vegetal e seleção de cultivares tolerantes à salinidade. In: GHEYI, H.R.; DIAS, N.S.; LACERDA, C.F. (ed.) **Manejo da salinidade na agricultura:** Estudos básicos e aplicados, Fortaleza: INCT Sal, 2010, p. 205-218.

FAO. Extent and Causes of Salt-affected Soils in Participating Countries. **FAO - Land and Plant nutrition management service**. 2008. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/topic2.htm#top.> Acesso em: 24 set. 2010.

FAUROBERT, M.; PELPOIR, E.; CHAÏB, J. Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. **Methods in Molecular Biology**, v.355, p.9-14, 2007.

FERREIRA, P.A.; SILVA, J.B.L.; RUIZ, H.A. Aspectos físicos e químicos de solos em regiões áridas e semiáridas. In: GHEYI, H.R.; DIAS, N.S.; LACERDA, C.F. (ed.) **Manejo da salinidade na agricultura:** Estudos básicos e aplicados, Fortaleza: INCT Sal, 2010, p. 21-41.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1445-54, 2004.

GANDONOU, C.B. et al. NaCl effect on in vitro sugarcane bud emergency African. **Journal of Biotechnology.** v.10, n.4, p.539-544, jan. 2011.

GAO, L. et al. Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). **Phytochemistry**, v.72, n.10, p.1180-1191, jul. 2011.

GIANNOPOLITIS, C. N.; Ries, S. K. Superoxide dismutase. **Plant Physiology**, Rockville, v.59, p. 309 – 314, 1977.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, Review, v.4, n.12, p.3665-3685, dec. 2004.

GUERZONI, J.T.S.G. **Avaliação da tolerância ao estresse salino de plantas de cana-de-açúcar trasnformadas com o gene P5CS**. 2010. 75f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

GUPTA, A.K.; KAUR, N. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. **Journal Bioscience**, v.30, n.5, p.761-776, dec. 2005.

HASEGAWA, P.M. et al. Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. **Annual Review of Plan Physiology and Plant Molecular Biology**, v.51, p.463-499, jun. 2000.

HASHIMOTO, M. et al. Novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stress, possibly via the jasmonic acid signalling pathway. **Plant Cell Physiology**, v.45, n.5, p550-559, may. 2004.

HE, X.J. et al. AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development. **Plant Journal**, v.44, p.903-916, 2005.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method of growing plants without soil**. Berkeley, University of California, 1950, 32p.

HOLANDA, J.S. et al. Qualidade da água para irrigação. In: GHEYI, H.R.; DIAS, N.S.; LACERDA, C.F. (ed.) **Manejo da salinidade na agricultura:** Estudos básicos e aplicados. Fortaleza: INCT Sal, 2010, p.43-61.

HURKMAN, W.J.; TANAKA, C.K. Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. **Plant Physiology**, v.81, p.802-806, 1986.

HUSSAIN, A. et al. Effect of salt stress on some growth attributes of sugarcane cultivars CP-77-400 and COJ-84. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.6, n.1, p.188-191, 2004.

HUSSEY, P.J.; KETELAAR, T.; DEEKS, M.J. Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. **Annual Review Plant Biology**, Review, v.57, p.109-125, 2006.

ISKANDAR, H.M. et al. Identification of drought-response genes and a study of their expression during sucrose accumulation and water deficit in sugarcane culms. **BMC Plant Biology**, v.13, p.11-12, jan. 2011.

JANICKA-RUSSAK, M. Plant Plasma Membrane H+-ATPase in Adaptation of Plants to Abiotic Stresses. In: SHANKER, A.; VENKATESWARLU, B. **Abiotic Stress Response in Plants – Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives**. Rijeka, InTech, 2011, p.197-218.

JELLOULI, N. et al. Proteomic analysis of Tunisian grapevine cultivar Razegui under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p.471-481, 2008.

JIANG, Y. et al. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.13, p.3591-3607, 2007.

JORGE, I. et al. Variation in the holm oak leaf proteome at different plant developmental stages, between provenances and in response to drought stress. **Proteomics**, v.6, Suppl., p.S207-214, apr. 2007.

KAWASAKI, S. et al. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. **Plant Cell**, v.13, n.4, p.889-905, apr. 2001.

KIM, Y.C. et al. Molecular characterization of a pepper C2 domain-containing SRC2 protein implicated in resistance against host and non-host pathogens and abiotic stresses. **Planta**, v.227, n.5, p.1169-1179, apr. 2008.

KIM, D.W. et al. A hydroponic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf. **Electrophoresis**, v.26, n.23, p.4521-4539, dec. 2005.

KOMATSU, S. et al. Comprehensive analysis of mitochondria in roots and hypocotyls of soybean under flooding stress using proteomics and metabolomics techniques. **Journal Proteome Research**, v.10, n.9, p.3993-4004, sep. 2011.

KOSOVÁ, K. et al. Plant proteome changes under abiotic stress – contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics, 2011**, v.74, n.8, p.1301-1322, aug. 2011.

LAUCHLI, A.; GRATTAN, S.R. Plant growth and development under salinity stress. In: JENKS, M.A.; HASEGAWA, P.M.; JAIN, S.M. (Eds). Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops, **Springer**, Netherlands, 2007, p.285-315.

LAWLOR, D.W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata *vs*. metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, v.89, p.871-885, 2002.

LIRA, N. P. V. ; MARTINS, T. R. ; PESTANA-CALSA, M. C. ; GRANDELLE, F. C. ; RIBEIRO, I. L. A. C. ; CALSA JR, T. Eficiência da extração proteica em cana-de-açúcar para análise proteômica. In: **XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**. 2009. Fortaleza-CE. *Anais*... Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal: Fortaleza 2009.

LIU, Y. et al. Identification of differentially expressed salt-responsive proteins in roots of two perennial grass species contrasting in salinity tolerance. **Journal Plant Physiology**, nov. 2011.

MANAA, A. et al. Salt and genotype impact on plant physiology and root proteome variations in tomato. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n.8, p.2797-2813, may. 2011.

MARCONDES, J.; GARCIA, A.B. Aspectos citomorfológicos do estresse salino em plântulas de arroz (*Oryza sativa* L.). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.2, p.187-194, abr./jun. 2009.

MEDEIROS, M. et al. Efeito da salinidade em plantas de cana-de-açúcar na fase inicial de crescimento. In: **JEPEX, X**. 2010. Recife. *Anais*... X JEPEX: UFRPE, 2010.

MENOSSI, M. et al. Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development. **International Journal of Plant Genomics**. 11p, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2216073/pdf/IJPG2008-458732.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2011.

MEHTA, A. et al. Rooteomics: the challenge of discovering plant defense-related proteins in roots. **Current Protein and Peptide Science**, v.9, p.108-116, 2008.

MITTLER R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**. v.9, n.10, p.490-498, oct. 2004.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant Cell and Environment**, v. 25, n.2, p.239-250, feb. 2002.

MUNNS R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, v. 167, n.3, p.645-663, jul. 2005.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mecanisms of Salinity Tolerance. **Annual Reviews Plant Biology**, v. 59, p.651-681, jun. 2008.

NARITA Y. et al. Characterization of the salt-inducible methionine synthase from barley leaves. **Plant Science**. V. 167, n. 5, p.1009-1016, nov. 2004.

NAVARRO, J. M. et al. Water relations and xylem transport of nutrients in pepper plants grown under two different salts stress regimes. **Plant Growth Regulation**, v.41, n.3, p.237-245, aug. 2003.

NOCTOR, G. et al. Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, 36 stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n.394, p.49-57, jan. 2004.

NOGUEIRA, R.J.M.C. et al. **Uso de ferramentas fisiológicas e bioquímicas para estudo da tolerância à salinidade em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) na fase inicial de crescimento**. In: 9º Congresso Nacional da STAB, 2008. p.687-691.

ODANAKA, S.; BENNETT, A.B.; KANAYAMA, Y. Distinct physiological roles of fructokinase isozymes revealed by gene-specific suppression of Frk1 and Frk2 expression in tomato. **Plant Physiology**, v.129, n.3, p.1119-1126, jul. 2002.

OGAWA, S.; MITSUYA, S. S-methylmethionine is involved in the salinity tolerance of *Arabidopsis* thaliana plants at germination and early growth stages. **Plant Physiology**, sep. 2011.

OUELLET, F. et al. Regulation of a wheat actin-depolymerizing factor during cold acclimation. **Plant Physiology**, v.125, n.1, p.360-36, jan. 2001.

PALMGREN, M.G. PLANT PLASMA MEMBRANE H+-ATPases: powerhouses for Nutrient Uptake. **Annual Review Plant Physiology Molecular Plant Biology**, v.52, p.817-845, jun. 2001.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**. v.405, n.6788, p.837-846, jun. 2000.

PANG, C. H.; WANG, B. S. Oxidative Stress and Salt Tolerance in Plants. **Progress in Botany**, v.69, n.3, p. 231-245, 2008.

PAPINI-TERZI, F.S. et al. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. **DNA Research**, v.12, n.1, p.27-38, 2005.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, n.3, p.324-349, 2005.

PARK, O.K. Proteomic studies in plants. **Journal Biochemistry Molecular Biology**. Review. v.37, n.1, p.133-138, jan. 2004.

PARKER, R. et al. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.5, p.1109-1118, 2006.

PARK, S.; RANCOUR, D.M.; BEDNAREK, S.Y. In planta analysis of the cell cycle-dependent localization of AtCDC48A and its critical roles in cell division, expansion, and differentiation. **Plant Physiology**, v.148, n.1, p.246-258, sep. 2008.

PENG Z, et al. A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.8, n.12, p.2676-2686, dec. 2009. Epub sep. 2009.

PRISCO, J.T.; GOMES FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: Gheyi, H.R.; Dias, N.S.; Lacerda, C.F. (ed.) **Manejo da salinidade na agricultura:** Estudos básicos e aplicados. Fortaleza: INCT Sal, 2010, p.143-159.

RAZAVIZADEH, R. et al. Proteome analysis of tobacco leaves under salt stress. **Peptides**, v.30, n.9, p.1651-1659, sep. 2009.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology,** v.161, n.11, p.1189-1202, nov. 2004.

REIS, M. B. A. **Análise comparativa de proteínas expressadas sob estresse hídrico em palma forrageira (*Opuntia cochenillifera*).** 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2009.

RIBEIRO, A.M.A et al. Comportamento da cana-de-açúcar, cultivar RB 867515 sob estresse salino. In: **JEPEX, X**. 2010. Recife. *Anais*... X JEPEX: UFRPE, 2010b.

RIBEIRO, I. L. A. C., COUTO, F.G., MARTINS, T. R., PESTANA-CALSA, M. C., CALSA JR,T. Sugarcane (*Saccharum* ssp.) stem parenchyma and leaf protein extraction for 2d-page proteome analysis In: **II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas.** 2009, Búzios - RJ. *Anais*... II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas: Búzios, 2009.

RIBEIRO, I. L. A. da C. **Proteômica de cana-de-açúcar em condição de estresse hídrico.** Recife, 2010c. 134 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

RIBEIRO, M.R. Origem e classificação dos solos afetados por sais. In: GHEYI, H.R.; DIAS, N.S.; LACERDA, C.F. (ed.) **Manejo da salinidade na agricultura:** Estudos básicos e aplicados. Fortaleza: INCT Sal, 2010 a. p.11-19.

RINALDUCCI, S. et al. Proteomic analysis of a spring wheat cultivar in response to prolonged cold stress. **Electrophoresis**. v.32, n.14, p.1807-1818, jul. 2011.

ROCHA, F.R. et al. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, v.8, n.71, 22p. 2007.

ROCHA, T.L. Eletroforese bidimensional e analise de proteomas. **Comunicado Técnico** – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n.136, p.1-12, 2005.

ROJE, S. S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. **Phytochemistry**, Review , v.67, n.15, p.1686-98, aug. 2006.

ROWLEY, E.R.; MOCKLER, T.C. Plant Abiotic Stress: Insights from the Genomics Era. **Abiotic Stress Response in Plants – Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives**. Rijeka, InTech, 2011, p.197-218.

RUIZ, H. A. et al. Características físicas de solos salino-sódicos submetidos a parcelamento da lâmina de lixiviação. **Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal**, v. 6, n.3, p.1-12, 2006.

SAHU, A.C.; SAHOO, S.K.; SAHOO, N. NaCl-stress induced alteration in glutamine synthetase activity in excised senescing leaves of a salt-sensitive and a salt-tolerant rice cultivar in light and darkness. **Plant Growth Regulation**, v.34, n.3, p.287-292, jul. 2001.

SAHU, B.B.; SHAW, B.P. Salt-inducible isoform of plasma membrane H+ATPase gene in rice remains constitutively expressed in natural halophyte, *Suaeda maritima*. **Journal Plant Physiology**, v.166, p.1077-1089, 2009.

SAIRAM, R.K.; TYAGI, A. Physiological and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, v.86, n.3, p.407-420, jun. 2004.

SÁNCHEZ-AGUAYO, I. et al. Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-L-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. **Planta**. v.220, n.2, p.278-85, aug. 2004.

SANTANA, M.J. et al. Efeitos da salinidade da água de irrigação na brotação e desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) e em solos com diferentes níveis texturais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n.5, p.1470-1476, set./out., 2006.

SCHOLANDER, P. F. et al. Hydrostatic pressure and osmotic potentials in leaves of mangroves and some other plants. **Proceedings of National Academy Science**, v.51, n.1, p.119-125, jul. 1965.

SHANNON, M.C.; GRIEVE, C.M. Tolerance of vegetable crops to salinity. **Science Horticulture**, v.78, p. 5-38, 1999.

SILVA, K.; LASKA, B.; BROWN, C.;SEDERO, H. W.;KHODAKOVSKAYA, M. Arabidopsis thaliana calcium-dependent lipid-binding protein (AtCLB): a novel repressor of abiotic stress response. **Journal of Experimental Botany**, p.1-11. 2011.

SILVA, P.; GERÓS, H. Regulation by salt of vacuolar H+-ATPase and H+-pyrophosphatase activities and Na+/H+ exchange. **Plant Signaling & Behavior**, Review, v.4, n.8, p.718-726, aug. 2009. Epub aug. 2009.

SILVEIRA, J.A.G. et al. Salt induced oxidative response in plants: damage or protection? In: Nogueira, R.J.M.C. et al. (eds). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: MXM Gráfica e Editora. 2005. parte.II, cap.9, p.106-117.

SOARES, C.Q.G. **Porteômica diferencial e caracterização fisiológicade dois clones de *Coffea canephora* sob déficit hídrico**. 2008, 98f Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

SOBHANIAN, H. et al. Salt stress induced differential proteome and metabolome response in the shoots of *Aeluropus lagopoides* (Poaceae), a halophyte C(4) plant. **Journal Proteome Research**. v.9, n.6, p.2882-2897, jun. 2010.

SUGIMOTO, M.; TAKEDA, K. Proteomic analysis of specific proteins in the root of salt-tolerant barley. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, v.73, n.12, p.2762-2765, dec. 2009. Epub dec. 2009.

TADA, Y.; KASHIMURA T. Proteomic analysis of salt-responsive proteins in the mangrove plant, Bruguiera gymnorhiza. **Plant and Cell Physiology**, v.50, n.3, p. 439-446, Mar 2009. Epub Jan 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719 p.

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

THOMAS, P.; SCHIEFELBEIN, J. Cloning and characterization of an actin depolymerizing factor gene from grape (*Vitis vinifera* L.) expressed during rooting in stem cuttings. **Plant Science**, v.162, n.2, p.283-288, feb. 2002.

TIECHER, A**. Efeito da radiação UV-C na expressão gênica e nas respostas bioquímico-fisiológicas em frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.)**. 2010. 70f Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

URANO, K. et al. 'Omics' analyses of regulary networks in plant abiotic stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.13, n.2, p.132-138, apr. 2010.

USDA-ARS. **United States Departament of Agriculture - Research Databases**. Bibliography on Salt Tolerance. 2008. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8908> Acesso em: 28 ago. 2010.

VAN DILLEWIJN, C.; WALTHAM, M. **Botany of sugarcane**. New York, Chronica Botanica, 1952. 371p.

VERMA, A.K. et al. Functional analysis of sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SS) in sugarcane (Saccharum) cultivars. **Plant Biology**, Stuttgart, v.13, n.2, p.325-32, mar. 2011.

VETTORE, A.L. et al. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, v.13, n.12, p. 2725-2735, 2003.

VILA, F.C. **Identificação dos flavonóides com atividade antioxidante da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2006. 68f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion Biotechnology**, Review, v.16, n.2, p.123-132, apr. 2005.

WACLAWOVSKY, A.J. et al. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v.8, n.3, p.263-276, apr. 2010.

WANG, M.C. et al. Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum/Thinopyrum ponticum*. **Proteomics**, v.8, n.7, p.1470-1489, apr. 2008.

WEISS, W.; GÖRG, A. Two-dimensional electrophoresis for plant proteomics. **Methods in Molecular Biology**, v.355, p.121-143, 2007.

WILLADINO, L.; CAMARA, T.R. Aspectos fisiológicos do estresse salino em plantas. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E. DE L.; WILLADINO, L.; CAVALCANTE, U.M.T. (eds). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife. MXM Gráfica e Editora. 2005. parte.II, cap. 10, p. 118-126.

WILLADINO, L. et al. Estresse salino em duas variedades de cana-de-açúcar: enzimas do sistema antioxidativo e fluorescência da clorofila. **Revista Ciência Agronômica**. v.42, n.2, p.417-422, abr.-jun. 2011.

WITZEL, K. et al. Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. **Journal of Experimental Botany**. v.60, n.12, p.3545-3557, 2009.

XU, C.; SIBICKY, T.; HUANG, B. Protein profile analysis of salt-responsive proteins in leaves and roots in two cultivars of creeping bentgrass differing in salinity tolerance. **Plant Cell Reports**. v.29, n.6, p 595-615, 2010.

XU WF, SHI WM. Expression profiling of the 14-3-3 gene family in response to salt stress and potassium and iron deficiencies in young tomato (*Solanum lycopersicum*) roots: analysis by real-time RT-PCR. **Annals of botany**. v.98, n.5, p. 965-974, nov. 2006.

YAN, S. et al. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. **Proteomics**, v.5, n.1, p.235-244, jan. 2005.

YANG, F. et al. Implications of high-temperature events and water deficits on protein profiles in wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Vinjett) grain. **Proteomics**. v.11, n.9, p.1684-1695, may. 2011.

YIN, X.; STRUIK, P.C. Modelling the crop: from system dynamics to systems biology. **Journal of Experimental Botany**, v.61, n.8, p.2171-2183, may. 2010.

YOKOTANI, N. et al. Overexpression of a rice gene encoding a small C2 domain protein OsSMCP1 increases tolerance to abiotic and biotic stresses in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v.71, n.4-5, p.391-402, nov. 2009.

YUKIO, N. et al. Characterization of the salt-inducible methionine synthase from barley leaves. **Plant Science**. v.167, n.5, p.1009-1016, nov. 2004.

ZHANG, W.H. et al. Tonoplast H+ -ATPase Activity in Barley Roots Is regulated by ATP and Pyrophosphate Contents Under NaCl Stress. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, v.30, n.1, p.45-52, feb. 2004.

ZHANG, H. et al. Mechanisms of Plant Salt Response: Insights from Proteomics. **Journal of Proteome Research**, oct. 2011.

ZHOU, C.J. et al. Cloning and characterization of a second form of the rice adenine phosphoribosyl transferase gene (OsAPT2) and its association with TGMS. **Plant Molecular Biology**.v.60, n.3, p.365-376, feb. 2006.

ZHU, J.K. Plant salt tolerance. **Trends in Plants Sciences**, v.6, n.2, p.66-71, feb. 2001a.

ZHU, J.K. Cell signaling under salt, water and cold stresses**. Current Opinion on Plant Biology**, v.4, n.5, p.401-406, oct. 2001b.

ZHU, J.K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Current Opinion on Plant Biology**, v.6, n.5, p.441-445, oct. 2003.

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.247-273, 2002.

ZÖRB, C.; SCHMITT, S.; MÜHLING, K.H. Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions. **Proteomics**, v.10, n.24, p.4441-4449. dec. 2010.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO A

9.1.2 Análise proteômica de folha de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante à salinidade) e RB855536 (sensível à salinidade) sob estresse por 200 mm de nacl cultivadas em casa de vegetação.

9.1.2.1 Extração, quantificação e integridade das proteínas

Foi possível extrair maior quantidade de proteínas solúveis totais das amostras de folha (0,370 mg/g – 0,833 mg/g) pelo método fenólico em comparação com os resultados obtidos para a quantificação de proteínas totais de raiz. Os valores médios variaram de 1,232 µg/µL a 2,777 µg/µL nas três réplicas biológicas para as duas variedades (**Figura 27**).

Nas folhas, foi verificada uma quantidade maior de proteínas solúveis totais na variedade sensível (RB855536) quando comparado com a tolerante (RB867515), inclusive após 2 h de exposição ao estresse, onde foi verificado o inverso do encontrado em raiz.

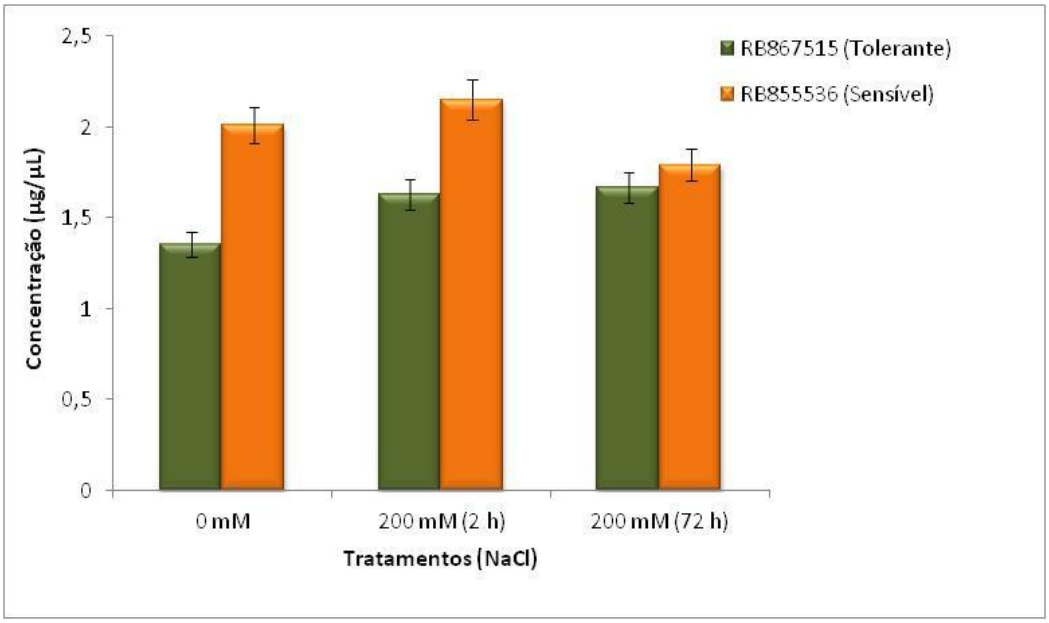


Figura 27. Quantificação através do método Bradford (1976) de proteínas totais de folha das variedades de cana-de-açúcar RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) cultivadas em casa de vegetação após 2 e 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl.

As proteínas extraídas apresentaram-se íntegras no gel, sem sinais significativos de degradação, com bandas nítidas e correlacionando totalmente com os dados de

quantificação de proteínas totais mostrando o gel com bandas mais fortes do que o gel apresentado para raiz (**Figura 28**).

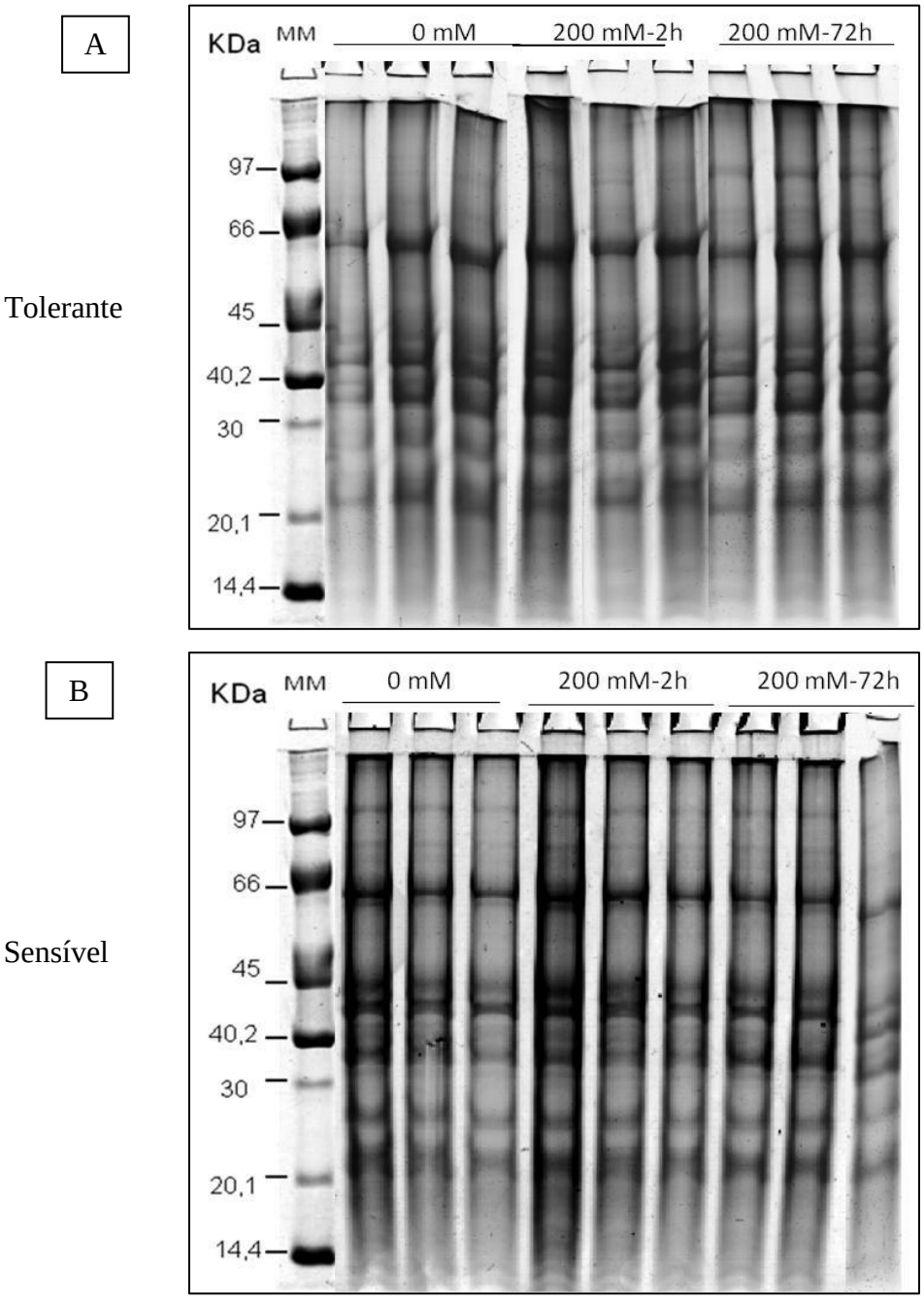


Figura 28. Gel SDS-PAGE (poliacrilamida 12,5%) de proteínas de folha de cana-de-açúcar. A) variedade RB867515 (tolerante), e (B) variedade RB855536 (sensível) cultivadas em casa de vegetação após 2 e 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. MM: Marcador Molecular (KDa); 1 - 3: 3 repetições do tratamento 0 mM; 4 – 6: 3 repetições do tratamento 200 mM (após 2 h de estresse); 7 - 9: 3 repetições do tratamento 200 mM (após 72 h de estresse).

9.1.2.2 Gel 2D PAGE

Os géis 2D de folha de cana-de-açúcar sob salinidade apresentaram a separação dos *spots* com padrão diferente do visualizado em raiz (**Figuras 29** e **30**).

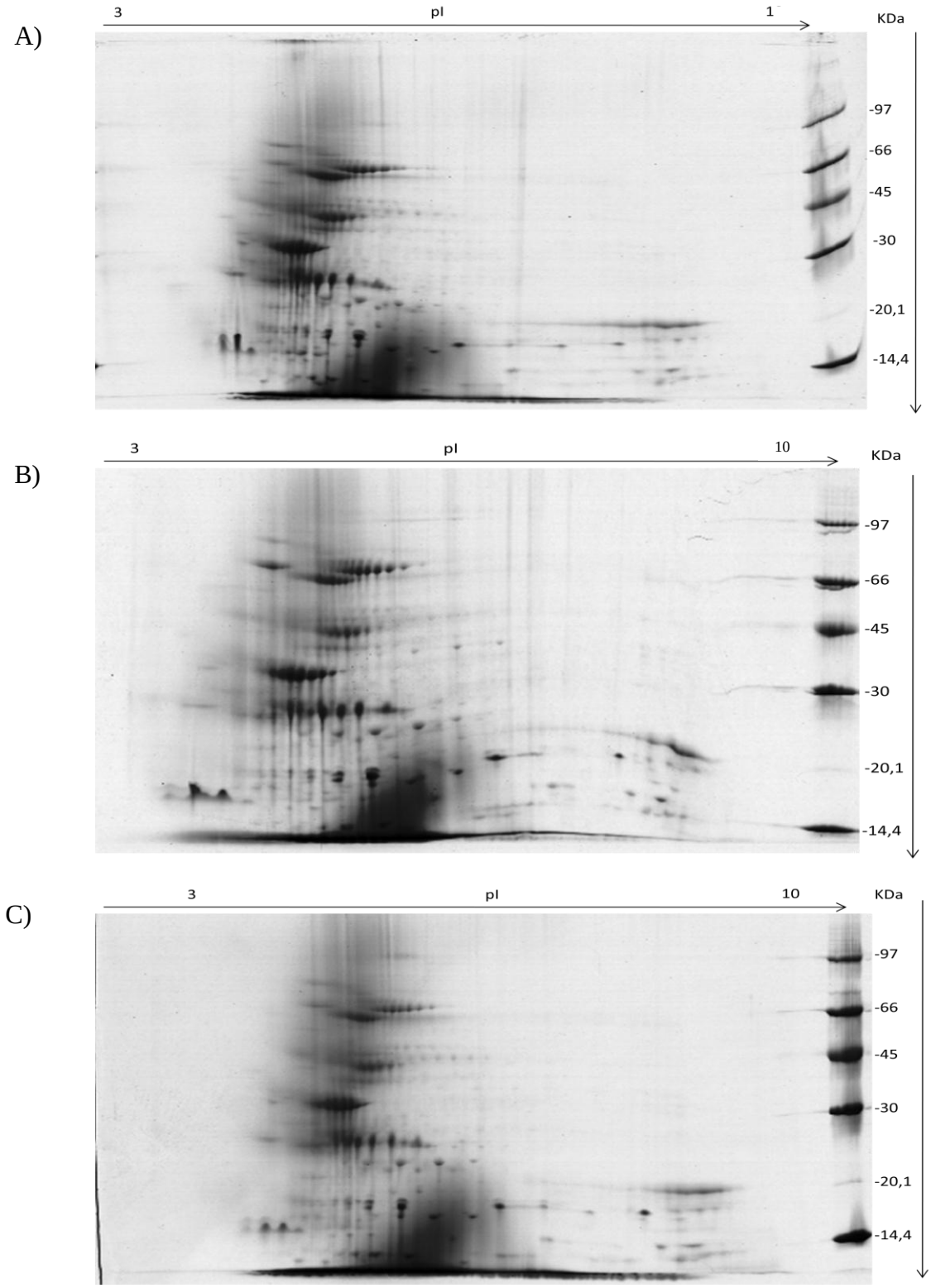


Figura 29. Géis 2D (poliacrilamida 12,5%) de proteínas totais corados com Coomassie blue de folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) sob salinidade cultivada em casa de vegetação. As proteínas (200 µg) foram separadas em fitas IPG de 11 com pH de 3 a 10. A) 0 mM de NaCl. B) Após 2 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. C) Após 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl.

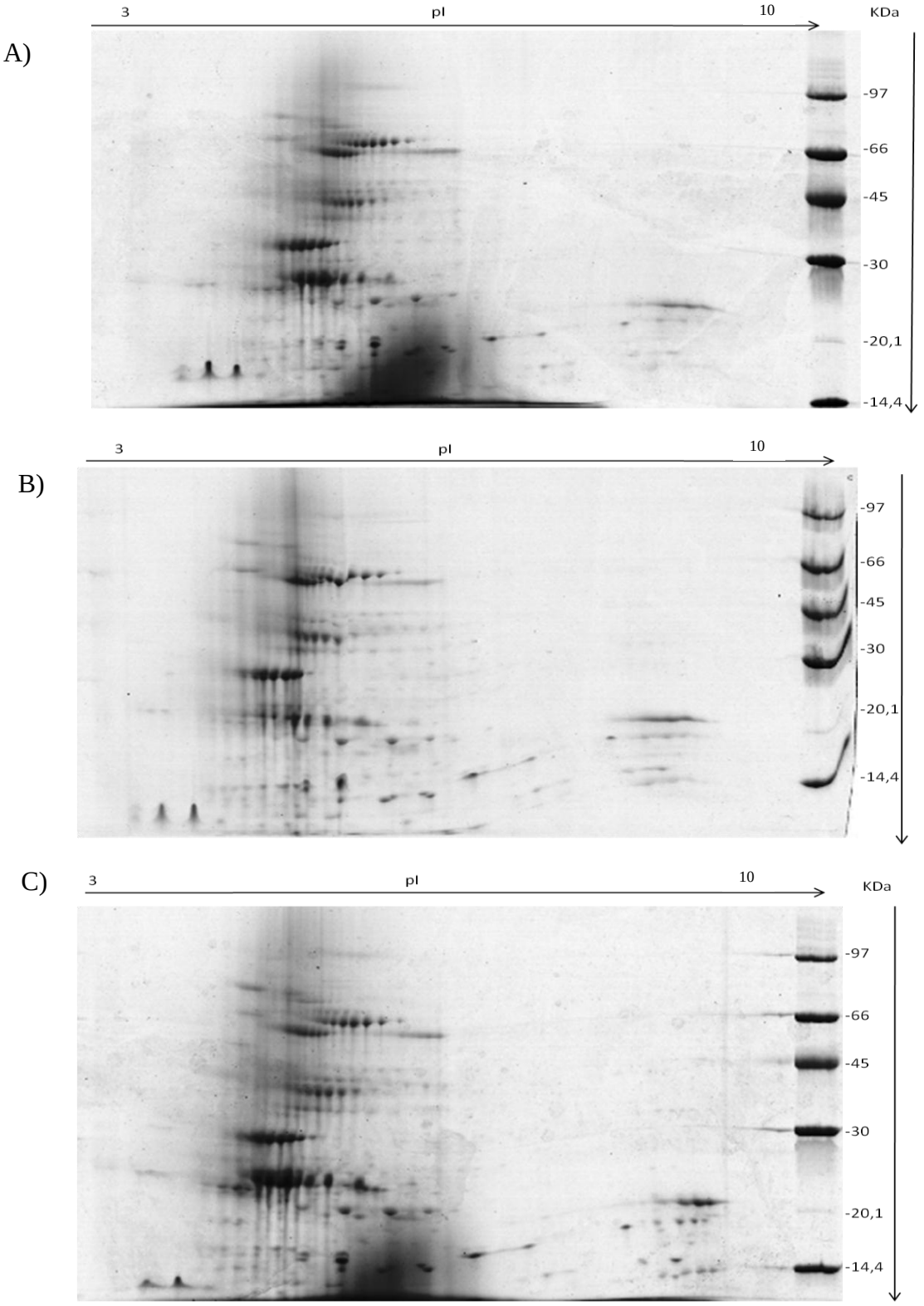


Figura 30. Géis 2D (poliacrilamida 12,5%) de proteínas totais corados com Coomassie blue de folha de cana-de-açúcar da variedade RB855536 (sensível) sob salinidade cultivada em casa de vegetação. As proteínas (200 µg) foram separadas em fitas IPG de 11 com pH de 3 a 10. A) 0 mM de NaCl. B) Após 2 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl. C) Após 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl.

9.1.2.3 Análise das imagens

A detecção de *spots* nos géis de folha foi maior do que o visualizado nos géis de raiz. A média do número total de *spots* em cada condição analisada para a variedade tolerante (RB867515) variou de 134 a 142, sendo este último correspondente à condição controle. Para a variedade sensível (RB855536) variou de 119 a 130, sendo este último verificado na condição após 2 h de exposição ao estresse por sal (**Figura 31**).

Da mesma forma, como na quantificação de proteínas solúveis totais nas folhas, foi detectado um maior número de *spots* nas réplicas da variedade sensível em relação à tolerante após 2 h de estresse salino em relação ao tratamento controle, e, portanto, o inverso do detectado entre os tratamentos nas réplicas de raiz.

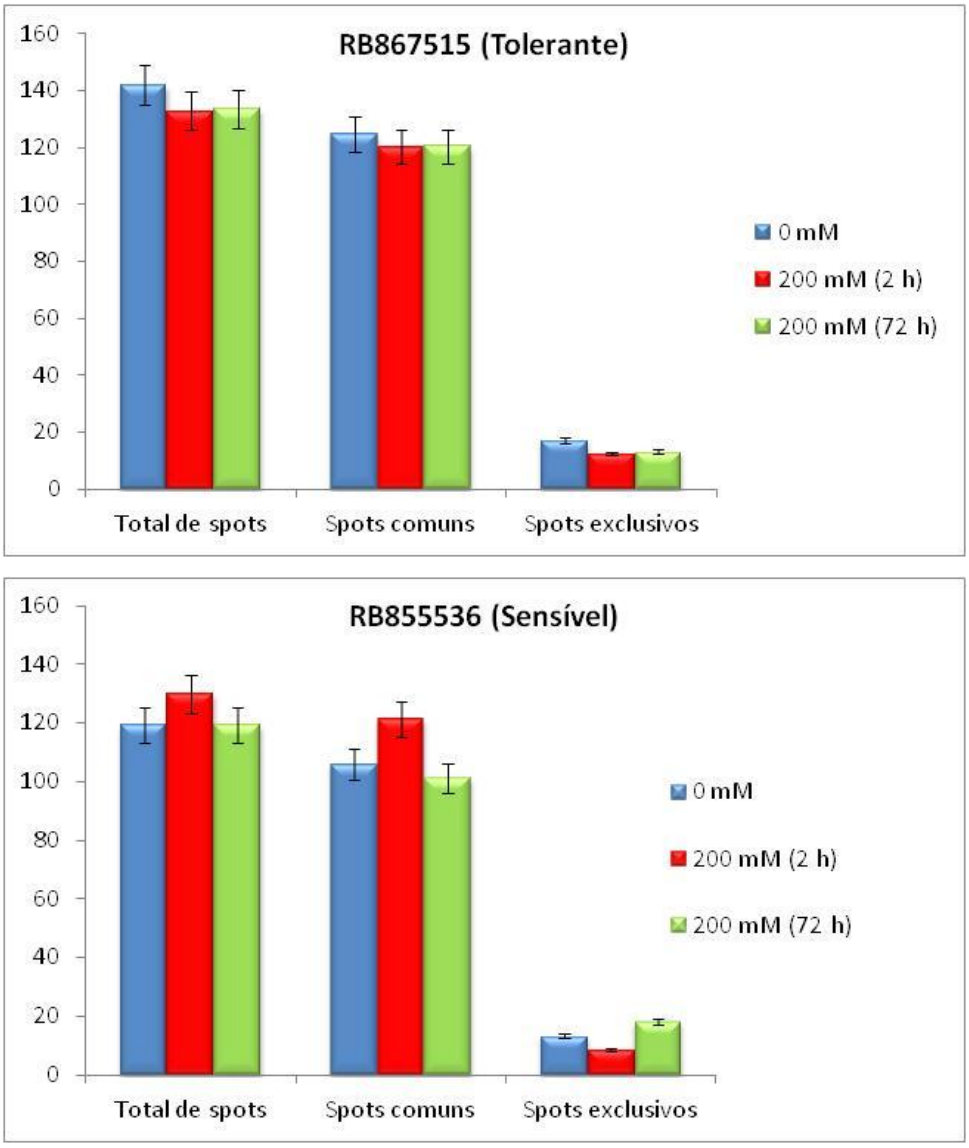


Figura 31. Valores médios do número total de *spots*, *spots* comuns e exclusivos de três réplicas biológicas de folha de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante à seca) e RB855536 (sensível) para cada tratamento analisado.

Conforme esperado, nas comparações realizadas no programa Image Master 2D Platinum v7.05 (GE Life Sciences) foram detectados mais *spots* comuns às condições salinas diferentes e às variedades dentro de uma mesma condição salina, em relação aos *spots* exclusivos de uma condição ou variedade (**Tabela 12**). Os números de *spots* comuns variaram de 117 a 133 e de 93 a 104 para variedade tolerante (RB867515) e sensível (RB855536) respectivamente. O maior número de *spots* exclusivos (75) foi encontrado na comparação entre as variedades na condição após 72 h de exposição ao estresse salino.

Tabela 12. Total de spots comuns e exclusivos de folha de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante à seca) e RB855536 (sensível) para cada comparação analisada.

Variedade	Comparações dos tratamentos (de NaCl)	*Spots* comuns	*Spots* exclusivos
RB867515	0 mM x 200 mM (2 h)	121	64
	0 mM x 200 mM (72 h)	133	46
	200 mM (2 h) x 200 mM (72 h)	117	44
RB855536	0 mM x 200 mM (2 h)	102	55
	0 mM x 200 mM (72 h)	93	70
	200 mM (2 h) x 200 mM (72 h)	104	64
RB867515 x RB855536	200 mM (2 h)	123	42
	200 mM (72 h)	91	75

As imagens das comparações feitas nos géis podem ser visualizadas nas **Figuras 32** e **33**, e conforme dito anteriormente os *spots* envoltos na cor verde são ditos comuns as condições salinas ou variedades e os na cor vermelhas são os *spots* exclusivos.

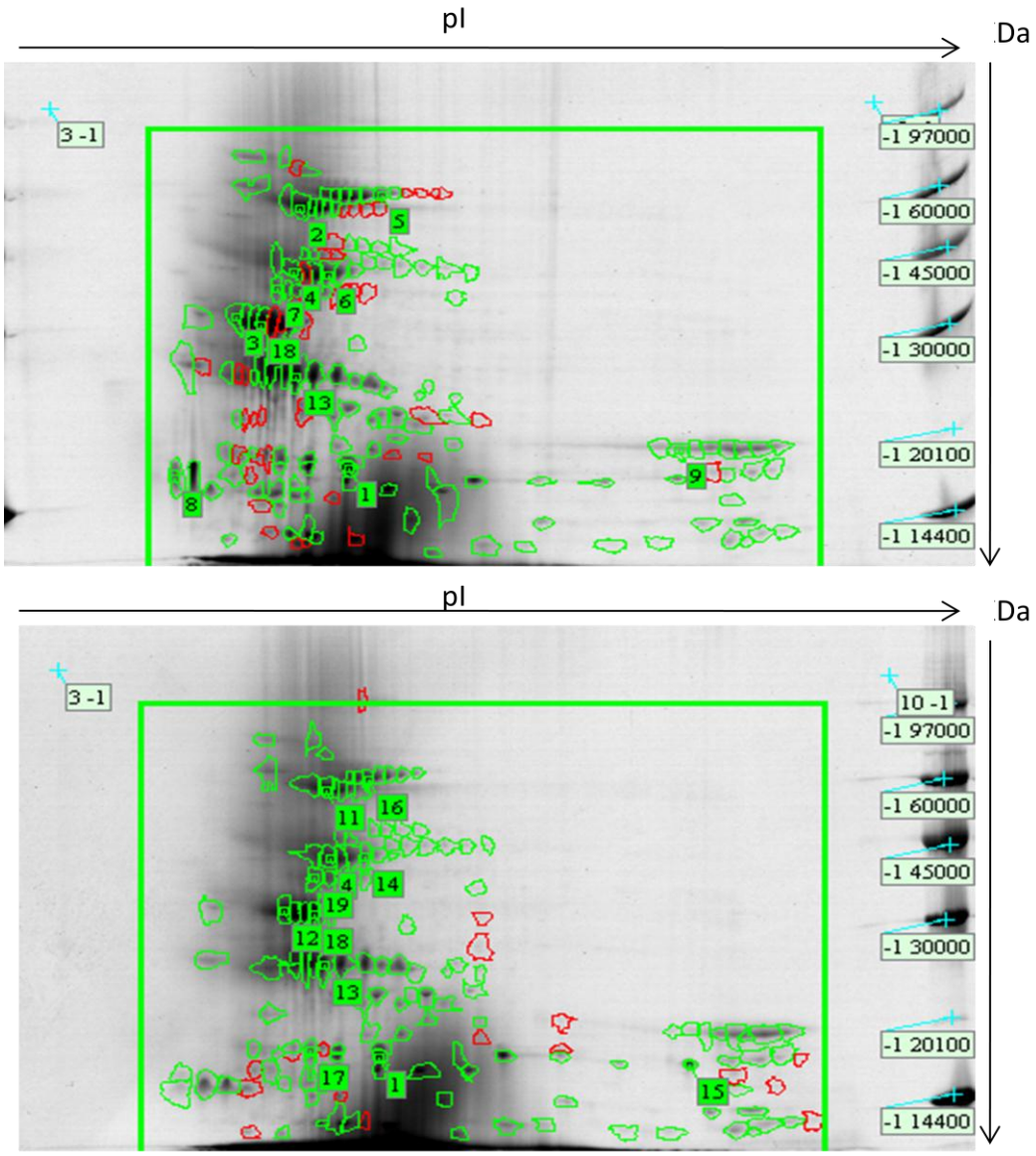


Figura 32. Análise comparativa entre as amostras de folha da variedade de cana-de-açúcar RB867515 (tolerante) cultivada em casa de vegetação. A) 0 mM de NaCl x B) 200 mM de NaCl após 72 h de exposição ao estresse (Gradiente de 11 cm). *Spots* envoltos com a cor verde: comuns as duas condições; *spots* envoltos com a cor vermelha: exclusivos de uma condição.

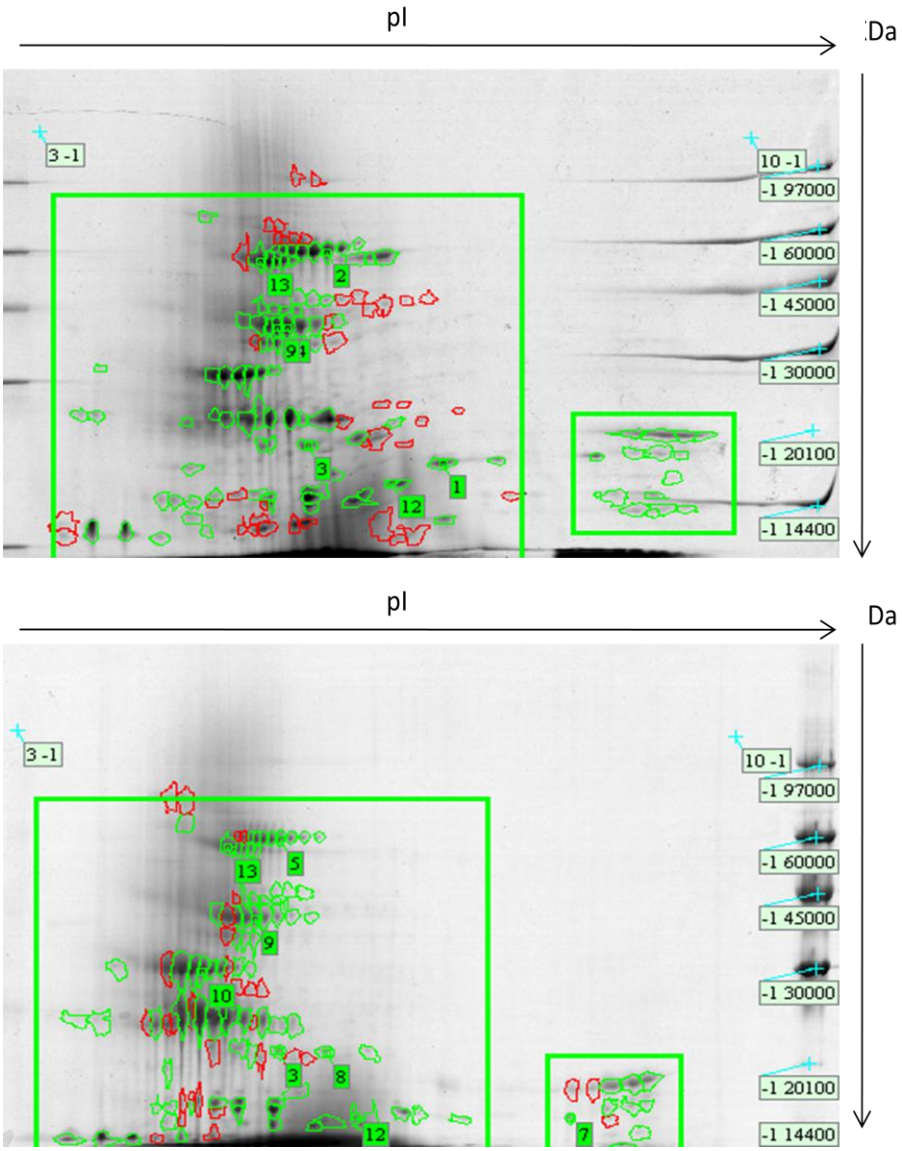


Figura 33. Análise comparativa entre as amostras de folha da variedade de cana-de-açúcar RB855536 (sensível) cultivada em casa de vegetação. A) 200 mM de NaCl (após 2 h de exposição ao estresse) x B) 200 mM de NaCl (após 72 h de exposição ao estresse) (Gradiente de 11 cm). *Spots* envoltos com a cor verde: comuns as duas condições; *spots* envoltos com a cor vermelha: exclusivos de uma condição.

Nas séries de comparações realizadas no programa Image Master 2D Platinum v7.05 (GE Life Sciences) quando foi adotada apenas a condição salina como variável, foi selecionado um total de 80 *spots* diferencialmente expressos para a variedade tolerante (RB867515) e 61 para a variedade sensível (RB855536). Esses números foram bem maiores do que os selecionados em raiz para ambas as variedades (**Figura 34**).

Na variedade RB867515 foi encontrado um número maior de *spots* diferencialmente expressos na condição controle quando comparado às duas condições salinas. Já para a variedade RB855536, esse resultado se deu quando comparou a

condição controle x 2 h de estresse salino e 2 h de estresse salino x 72 h, o que mostra que as variedades se comportaram de forma diferente quando expostas à salinidade em escala temporal.

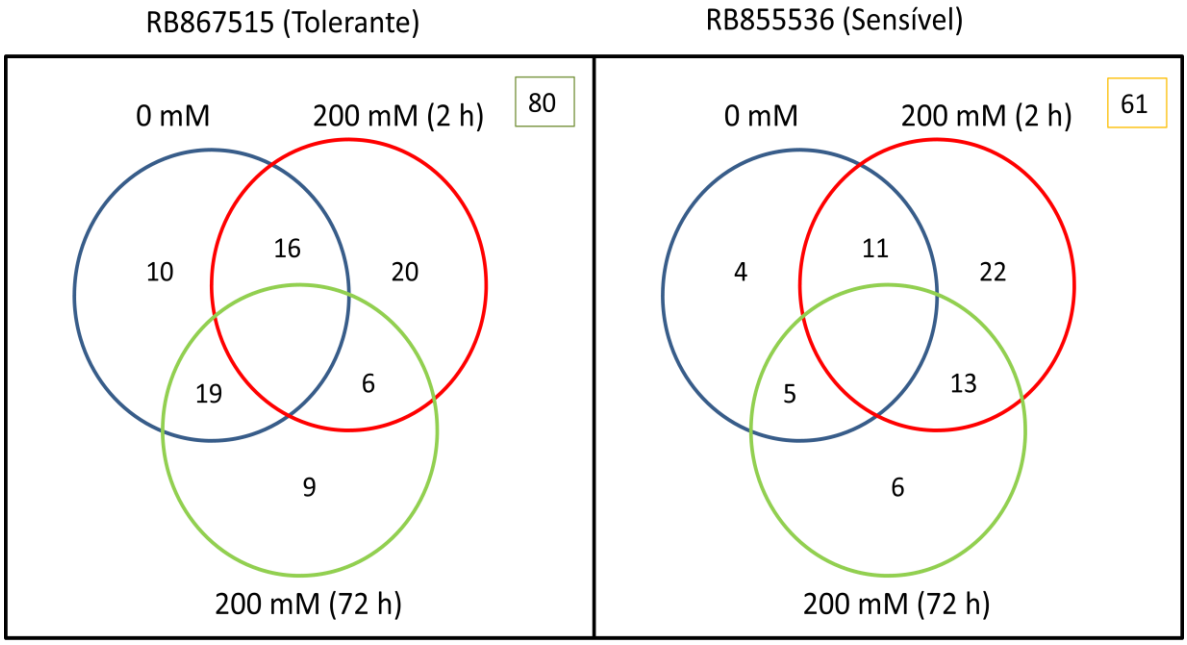


Figura 34. Total de *spots* diferencialmente expressos de folha de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (tolerante) e RB855536 (sensível) cultivada em casa de vegetação sob estresse por 200 mM de NaCl. Foram selecionados para digestão e identificação, os *spots* que apresentaram a razão da %Vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05.

Na comparação realizada entre variedades dentro de uma mesma condição salina, também foram selecionados *spots* diferencialmente expressos, sendo que 16 para condição após 2 h de exposição ao estresse por 200 mM de NaCl e 17 para após 72 h (**Figura 35**).

Dentro da condição após 2 h de exposição ao estresse por 200 mM de NaCl o número de *spots* foram balanceados para as variedades, porém após 72 h de estresse foi observado um maior números de *spots* diferencialmente expressos exclusivos da variedade tolerante (RB867515).

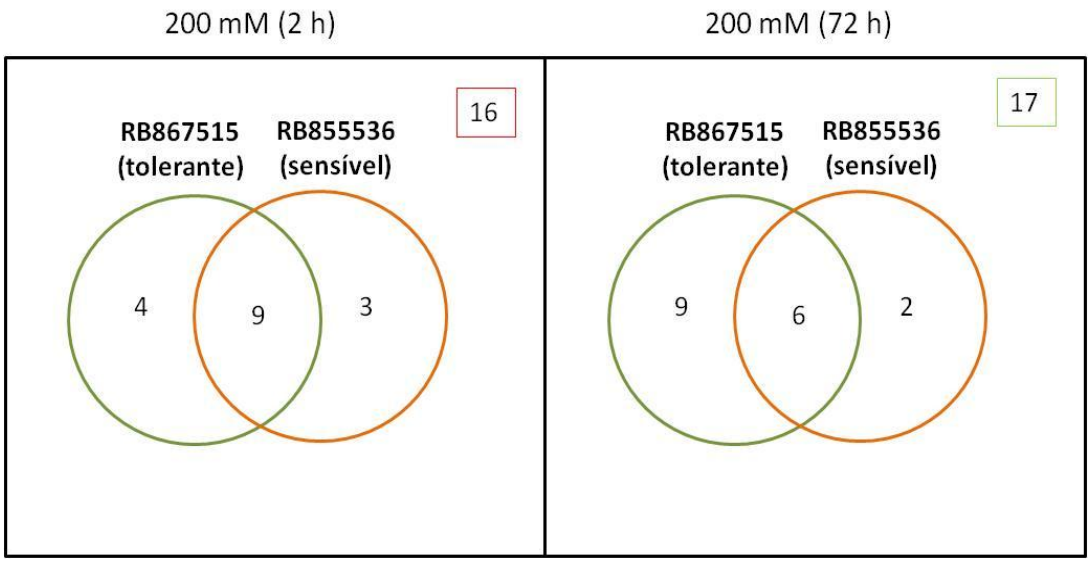


Figura 35. Total de *spots* diferencialmente expressos de folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) X RB855536 (sensível) sob estresse por 200 mM de NaCl cultivadas em casa de vegetação. Foram selecionados para digestão e identificação os *spots* que apresentaram a razão da %Vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05.

Não foi possível realizar a identificação dos peptídeos diferencialmente expressos em tempo hábil, devido a problema técnico no espectrômetro de massas disponibilizado por colaboração. As amostras de proteínas foliares (138) com razão da variação de %Vol ≥ 1,5 e ANOVA ≤ 0,05 foram enviadas para identificação via MS, aguardando para complementação da análise.

9.2 ANEXO B

9.2.1 Validação transcricional (RT-qPCR)

9.2.1.1 Desenho de iniciadores para validação transcricional (RT-qPCR)

As Tabelas 13 e 14 apresentam os iniciadores desenhados para amplificação específica de regiões presumivelmente codificantes das proteínas selecionadas, com variação significativa no nível traducional entre amostras contrastantes para estresse por salinidade. Foram obtidas sequências de iniciadores em conformidade com os parâmetros ajustados no programa Primer3, favoráveis à maior eficiência e especificidade na amplificação via RT-qPCR. A análise dos iniciadores selecionados realizada com

utilização do programa NetPrimer demonstrou que não há predição de auto-anelamento, dimerização ou dimerização cruzada dentre cada par de iniciadores, o que tende a permitir maior especificidade na amplificação futura das regiões alvo codificantes e, portanto, maior confiabilidade nos dados para validação transcricional da expressão dos respectivos genes em relação à resposta ao estresse por salinidade.

Tabela 13. Pares de iniciadores das proteínas diferencialmente expressas de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB867515 (tolerante) em condições de salinidade.

Acesso TC/ singlet	Primer Forward (5' - 3')	Primer Reverse (5' - 3')	Produto (pb)	Tm (^{o}C) PF	Tm (^{o}C) PR	Anotação	Espécie	E-value TIGR	% similaridade
CA202426	CGATGGACTTGATGACTGCT	AGGGTGAACATTGGTGCT	198	58,83	56,33	Proteína ribossomal 40S S12 (RPL12)	*Hordeum vulgare*	$1,2x10^{-5}$	98,61
CA149105	GAGGCGTATCTGGTCACTT	GCTCGTTCACCTTCTTGG	109	55,2	56,83	Fenilalanina amônia-liase (PAL)	*Saccharum officinarum*	$1,2x10^{-5}$	93,87
CA282598	TCAGCACTCTCCAGTCTCTT	AGCATCAACCTCAACCAC	170	55,12	54,17	Metionina sintase (MetS)	*Zea mays*	0,0061	98,77
CA296734	GGGGAGGAGTCATACAAAG	AAGAAGTGAGGGGAAGAGG	245	54,49	55,87	Proteína 14-3-3	*S. hybrid cultivar CP65-357*	0,0055	100
CA190621	GGTTCCTTCTTCTCCCTCTC	GCCATCCTTCAACTTCTCAC	268	56,94	57,29	Sacarose sintase (SS2)	*Z. mays*	$6,9x10^{-7}$	97,96
CA296871	CAGGTCCCGTCCATCTTT	AGTTTGGTTCCGCTGTTG	224	58,42	57,21	Superóxido dismutase [Mn] (Mn-SOD)	*Z. mays*	0,015	93,98
CA150195	CTGAGGGACTGGCTAAAGA	CTCCACCGACAAGGAAAC	139	55,54	56,48	Isomerase triosefosfato citosólica (TPI)	*Z. mays*	0,15	95,73
TC135669	AGGAGGAAGAGAAGAACGAG	ATGAGGAAGCCAGCAACA	154	55,32	57,82	Fosfoglicerato quinase (PGK)	*Oryza sativa subsp. indica (Rice)*	9,9	97,62
CA138006	GCCCCTTCTCTCCTCTTT	GTCATTCACAGCGACACC	124	55,93	55,75	Fator de depolimerização de actina 3 (ADF 3)	*Z. mays*	0,00053	97,71

Tabela 14. Pares de iniciadores das proteínas diferencialmente expressas de raiz de cana-de-açúcar da variedade RB855536 (sensível) em condições de salinidade.

Acesso TC/ singlet	Primer Forward (5' - 3')	Primer Reverse (5' - 3')	Produto (pb)	Tm (°C) PF	Tm (°C) PR	Anotação	Espécie	E-value TIGR	% similaridade
CA299422	CCACTAATCCGACTTTCCTC	AAACCCCCTGGTGCTCTAC	164	56,32	59,00	Proteína predita	*Zea mays*	0,0014	97,56
CA236891	GTCCCTGTCCTTCTCCTT	GCAGCATCACCCTTGTAG	156	53,90	55,09	Frutose bifosfato aldolase (FBA)	*Z. mays*	$3,7x10^{-7}$	98,25
CA108939	GGTTGTTGAGTGTGCTTGTG	GCGTCAGCCAGAAAATAG	207	57,71	54,45	Adenina Fosforibosiltransferase (APRT)	*Triticum aestivum*	0,00064	95,35
CA091184	AAGGCGTGGAGGTCAAAA	GGAAACCCGAAGAGGATG	145	59,21	57,98	Quinona redutase	*T. monococcum*	$5,6x10^{-8}$	94,44
CA170040	ATGGAAGGAGGCGGATTT	AAACCAAAGCGACAGCAC	100	59,44	57,37	Frutoquinase-2 (Frk 2)	*Z. mays*	0,00052	99,34
TC104633	CCGTGACTGGAAGTATCTCT	AGCAGGATTGAAGTGTGG	113	54,32	54,38	Superóxido dismutase [Cu-Zn] - (Cu-Zn SOD)	*Z. mays*	$2x10^{-5}$	98,01
CA295552	TGTAGCCCCACTCGTTGT	GGAGGAGGATTTGGTTTC	131	57,58	54,32	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase, citossólica (GAPDH)	*Z. mays*	0,0033	94,78
TC141093	GCCTATCAAGGGGGAGTT	CTTAGTGGCATCAGGAAGG	163	56,53	55,84	Ascorbato peroxidase (APX)	*Pennisetum glaucum*	0,00098	96,84
TC88924	GCCGACATCAACACCTTC	AACAAACCGACACGACAC	227	57,47	55,17	Glutamina sintetase (GS)	*Saccharum officinarum*	0,0016	100
TC115432	GCATTCAGCAAAGCACGA	GCCAAGACAATACCTCCA	141	59,66	54,33	ATP sintase vacuolar subunidade E	*T. aestivum*	1,9	95,54

10 MEMORIAL

Nome: Cinthya Mirella Pacheco
Data de nascimento: 08/03/1986
e-mail profissional: cinthya.m.pacheco@gmail.com

Possui graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (2009). Atualmente é mestranda do Programa de pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco. Tem experiência em Fisiologia Vegetal clássica e Genética vegetal, com ênfase em proteômica, principalmente em respostas de plantas a estresse por salinidade.

Durante o período do mestrado obteve as seguintes publicações:

Artigos completos publicados em periódicos:

1. Graciano, Erika S. A.; Nogueira, Rejane J. M. C.; Lima, Danúbia R. M.; Pacheco, Cinthya M.; Santos, Roseane C. **Crescimento e capacidade fotossintética da cultivar de amendoim BR 1 sob condições de salinidade**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental (Online), v. 15, p. 794-800, 2011.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. PENA, E. P. N.; FOLHA, REO ; PACHECO, C. M.; SOUZA, A. E. R.; LIRA, N. P. V.; PESTANA-CALSA,MC; CALSA JR, T. **Análise cloroplastidial de sorgo relacionado á síntese de carboidratos para produção de bioetanol**. In: XI JEPEX, 2011, Recife. Anais do XI JEPEX, 2011.

2. SOUZA, J.M.; PACHECO, C. M.; OLIVEIRA, R.S.; PENA, E.P.N.; PESTANA-CALSA M. C.; CALSA JUNIOR, T. **Comparação do proteoma de folha e raiz de cana-de-açúcar em condições de salinidade**. In: II

Simpósio Pernambucano de Biologia Aplicada: Biotecnologia aplicada na saúde, produção industrial e conservação ambiental, 2011, Recife - PE.

3. LIMA, D.R.M. ; MEDEIROS, D. B. ; PACHECO, C. M. ; NOGUEIRA, R.J.M.C. **Alterações no status hídrico foliar demangabeiras submetidas a níveis crescentes de NaCl**. In: Simpósio Brasileiro de Salinidade, 2010, Fortaleza. Simpósio Brasileiro de Salinidade, 2010.

4. PACHECO, C. M.; PESTANA-CALSA M. C.; NOGUEIRA, R.J.M.C.; CALSA JUNIOR, T. **Danos fisiológicos em genótipos de cana-de-açúcar sob condições de salinidade**. In: Simpósio Brasileiro de Salinidade, 2010, Fortaleza. Simpósio Brasileiro de Salinidade, 2010.

5. MEDEIROS, D. B.; PACHECO, C. M.; LIMA, D.R.M.; SANTOS, H.R.B.; NOGUEIRA, R.J.M.C. **Modificações no status hídrico de dois genótipos do BAG de aceroleira da UFRPE sob restrição hídrica**. In: XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2010, Natal. Frutas: saúde, inovação e sustentabilidade, 2010.

Resumos publicados em anais de congressos

1. PACHECO, C. M.; PESTANA-CALSA M. C.; ALMEIDA, R.R.; LIRA, N. P. V.; NOGUEIRA, R.J.M.C.; CALSA JUNIOR, T. **Sugarcane root differential proteome under salinity**. In: III Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2011, Ilhéus - BA. III Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2011.

2. SOUZA, A. E. R.; PACHECO, C. M.; FOLHA, R. E. O.; LIRA, N. P. V.; MACIEL, L. S.; ALMEIDA, R.R.; PESTANA-CALSA M. C.; CALSA JUNIOR, T. **Differential peptides from salt-sensitive sugarcane roots**. In: X-Meeting 2011 (AB3C / SoIBio), 2011, Florianópolis. X-Meeting 2011 (AB3C / SoIBio), 2011.

3. PACHECO, C. M.; FOLHA, R. E. O.; SOUZA, A. E. R.; LIRA, N. P. V.; MACIEL, L. S.; ALMEIDA, R.R.; PESTANA-CALSA M. C.; CALSA JUNIOR, T. **Proteomics of drought-tolerant sugarcane roots under salinity**. In: X-Meeting 2011 (AB3C / SoIBio), 2011, Florianópolis. X-Meeting 2011 (AB3C / SoIBio), 2011.

4. GOMES, N. O. C.; FOLHA, R. E. O. ; MANSO, T. C. ; PACHECO, C. M. ; LIRA, N. P. V. ; SOUZA, A. E. R. ; ALMEIDA, R.R. ; PESTANA-CALSA M. C. ; CALSA JUNIOR, T. **In silico transcriptome matching of mass-spectometry-derived protein sequece associated to salinity tolerance in sugarcane roots**. In: X-Meeting 2011 (AB3C / SoIBio), 2011, Florianópolis. X-Meeting 2011 (AB3C / SoIBio), 2011.

5. SANTANA M. O. ; PACHECO, C. M. ; OLIVA O. L.; PESTANA-CALSA M. C. ; NOGUEIRA, R.J.M.C. ; CALSA JUNIOR, T. **Avaliação da brotação de quatro variedades de cana-de-açúcar (Saccharum spp.) em terra vegetal composta**. In: XXXIII Reunião Nordestina de Botânica, 2010, Aracaju. XXXIII Reunião Nordestina de Botânica Flora Nordestina: Diversidade, conhecimento e conservação, 2010.

6. SANTANA M. O.; PACHECO, C. M.; MEDEIROS, D. B.; OLIVA O. L.; PESTANA-CALSA M. C.; NOGUEIRA, R.J.M.C.; CALSA JUNIOR, T. **Análise comparativa da brotação de quatro variedades de cana-de-açúcar cultivadas em substrato arenoso**. In: XXXIII Reunião Nordestina de Botânica, 2010, Aracaju. XXXIII Reunião Nordestina de Botânica Flora Nordestina: Diversidade, Conhecimento e Conservação, 2010.

7. PACHECO, C. M.; PESTANA-CALSA M. C.; SANTOS C. A.; SILVA, M. A.; SILVA, N. V.; SANTANA M. O. ; MELO T. T. A. T.; NOGUEIRA, R.J.M.C. ; CALSA JUNIOR, T. **Gas exchanges in sugarcane genotypes under salinity stress**. In: 2nd Pan American Congress on Plants and BioEnergy,

2010, Águas de São Pedro-SP. 2nd Pan American Congress on Plants and BioEnergy, 2010.

8. NOGUEIRA, R.J.M.C.; MEDEIROS, D. B.; SILVA, N. V.; PACHECO, C. M.; LIMA, D.R.M. **Avaliação dos efeitos do déficit hídrico no crescimento e produção de matéria de mudas de gravioleira**. In: XXXIII Reunião Nordestina de Botânica, 2010, Sergipe. XXXIII Reunião Nordestina de Botânica, 2010.

9. PACHECO, C. M.; PESTANA-CALSA M. C.; SANTOS C. A.; SILVA, M. A.; SILVA, N. V.; SANTANA M. O. ; ALMEIDA, R.R.; Melo T. T. A. T. ; NOGUEIRA, R.J.M.C. ; CALSA JUNIOR, T. **Gas Exchanges in Sugarcane Genotypes under Salinity Stress.** In: 1st Brazilian-German Meeting of Plant Systems Biology and Bioenergy, 2010, Recife. 1st Brazilian-German Meeting of Plant Systems Biology and Bioenergy, 2010.