

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

REGINA ELISABETY OLIVEIRA FOLHA

PROTEÔMICA DE CLOROPLASTOS DE PINHÃO-MANSO
(*Jatropha curcas* L.) ASSOCIADA AO ESTRESSE POR
DÉFICIT HÍDRICO E SALINIDADE

Recife
2013

REGINA ELISABETY OLIVEIRA FOLHA

**PROTEÔMICA DE CLOROPLASTOS DE PINHÃO-MANSO
(*Jatropha curcas* L.) ASSOCIADA AO ESTRESSE POR
DÉFICIT HÍDRICO E SALINIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior

Co-orientadora: Dra. Maria Clara Pestana Calsa

Recife

2013

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Folha, Regina Elisabety Oliveira

Proteômica de cloroplastos de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) associada ao estresse por déficit hídrico e salinidade / Rafaela Cavalcanti Lira. – Recife: O Autor, 2014.

95 f.: il.

Orientadores: Tercilio Calsa Júnior, Maria Clara Pestana Calsa

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Genética, 2014.

Inclui bibliografia

1. Peptídeo 2. Pinhão-mansão I. Calsa Júnior, Tercilio (orient.) II. Calsa, Maria Clara Pestana (coorient.) III. Título.

572.65

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-134

REGINA ELISABETY OLIVEIRA FOLHA

**PROTEÔMICA DE CLOROPLASTOS DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas*
L.) ASSOCIADA AO ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO E SALINIDADE**

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Ana Christina Brasileiro Vital
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Katia Castanho Scortecchi
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Recife
2013

Dedico aos meus pais, irmãos, namorado, amigos, colegas de trabalho e aos orientadores pelo apoio, força, companheirismo e amizade, pois sempre incentivaram a perseguir meu ideal, dedico.

Agradecimentos

À DEUS por ter proporcionado a oportunidade de iniciar e concluir esse trabalho, apesar de todas as dificuldades encontradas.

Ao meu orientador, Profº Tercilio Calsa Junior, por quem tenho profunda admiração e que acreditou em mim: acolhendo, desenvolvendo o meu potencial, incentivando a continuar lutando, apesar de todas as adversidades, aconselhando e estimulando a procurar sempre outras alternativas para solucionar os problemas. Agradeço pelos seus ensinamentos, orientação, e apoio profissional.

A minha co-orientadora Maria Clara Pestana, que foi uma das pessoas que me fez ficar encantada com a ciência, principalmente pelo que faz e a forma de compartilhar os seus conhecimentos científicos.

Aos amigos e colegas de Laboratório, meus babies, que desde o princípio fizeram parte na minha jornada acadêmica, acompanhado dia a dia cada decisão, expectativa, frustração e alegria, sempre ao meu lado e pela rica experiência que levarei dos trabalhos realizados com cada um, pois cada pessoa tem uma característica predominante que faz do grupo LGPP ser uma equipe sinérgica: Cinthya (Mini baby), uma das pessoas mais dedicadas, companheira e proativa; Nayara (coração) é inteligentíssima e sempre disposta a ajudar; Elton (meu pupilo) é menino muito esforçado e batalhador, contente com a vida, e que vem travado junto comigo uma verdadeira batalha para extrair proteína de cloroplasto; Adauto é um companheiro de viagem, dedicadíssimo no que faz e muito competente; Amanda Rocha é uma amiga do peito, parceira, muito guerreira,

apesar das adversidades consegue superar rápido os desafios que a vida tem lhe colocado; Renata, seu nome é praticidade, muito disposta e batalhadora; Taciana, extremamente eficaz e muito comprometida com suas responsabilidades; Raul, parceiro, Juliana e Maria, são meninas ativas e talentosas; Celuza obrigada pelas conversas, afagos, abraços e pela representatividade de mãe do laboratório; Fabiana é uma pessoa que entrou na minha vida a pouco tempo, contudo já se mostrou ser muito disponível e perspicaz; Romel, Janira, Paulo, Amandinha, Renata Oliveira, Marciana e João agradeço por tudo .

Aos amigos (fafiates: Ananda, Daniely, Jessika, Helayne, Nara, Nataly, Vanessa; Susana, Gabriela e Janaina), obrigada por todos que fizeram parte de mais esta fase da minha vida.

Aos meus pais, Rosicleide e Aessio, que desde o princípio acompanharam a minha jornada, sempre me apoiando, ajudando e incentivando em todas as circunstâncias da minha vida, assim como todos os parentes que fizeram parte da minha trajetória.

Aos meus irmãos, Thaisa e Vinicius, e ao meu namorado Neto, pela compreensão e companheirismo, obrigada por todo o apoio.

À UFRPE e ao Laboratório de Fisiologia Vegetal (Prof^a Rejane Mansur e toda a sua equipe, em especial a Marcele, Cinthya e Hugo) pela disponibilidade e ajudar no experimento fisiológico de pinhão-mansão.

Aos colegas e amigos de trabalho que indiretamente auxiliaram na conclusão deste trabalho.

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

Muito obrigada!

“O universo é do tamanho do seu mundo, e seu mundo é do tamanho dos seus sonhos.”

Sean Wilhelm

Resumo

O pinhão-manso é uma espécie vegetal com grande potencial para produção de biodiesel a partir de óleo extraído das sementes, composto principalmente por ácidos graxos sintetizados primariamente nos cloroplastos. A determinação do proteoma cloroplastidal de pinhão-manso, submetido a estresse por salinidade e déficit hídrico, revelou alterações provavelmente associadas a mecanismos de regulação gênica, metabólica e fisiológica para adaptação da planta. Este trabalho teve como objetivo a identificação de peptídeos expressos nos cloroplastos de pinhão-manso submetido ao estresse hídrico e salino, através do mapeamento eletroforético (1D e 2D) e espectrometria de massas. Na análise proteômica, as proteínas cloroplastídias foram extraídas, quantificadas e analisadas por eletroforese unidimensional e bidimensional. No tratamento salino, sete fragmentos do perfil eletroforético 1D controle, após duas ou 72 h sob aplicação do estresse foram excisados, digeridos com tripsina e identificados via espectrometria de massas. No tratamento com déficit hídrico, seis fragmentos do perfil eletroforético 1D controle ou sob estresse, assim como 14 *spots* diferencialmente expressos entre os perfis 2D, foram também analisados via espectrometria de massas. Foram identificadas presumivelmente mais de 35 proteínas, categorizadas em processo de geração de energia, metabolismo de carboidratos e em respostas de defesa a estresses abióticos. O padrão de comportamento dos peptídeos identificados sugere a existência de mecanismos de ajuste fisiológico para tolerância aos fatores de estresse estudados. Estas proteínas podem ser candidatas para investigações futuras de caracterização estrutural e funcional em estratégias de seleção e melhoramento genético para conferir maior tolerância à salinidade e ao déficit hídrico em pinhão-manso.

Palavras-chave: estresse abiótico, peptídeos, cloroplasto.

Abstract

Physic nut is a plant species with high potential for biodiesel production from its extracted seeds oil, composed mainly of fatty acids primarily synthesized in chloroplasts. Determination of physic nut chloroplast proteome, under stress by water deficit or salinity, revealed alterations probably associated to mechanisms of gene, metabolic and physiological regulation towards plant adaptation. This work had as objective the identification of physic nut expressed chloroplast peptides submitted to water deficit or salinity stress through electrophoretical mapping (1D and 2D) and mass spectrometry. In proteomic analysis, chloroplast proteins were extracted, quantified and analysed by unidimensional and bidimensional electrophoresis. In saline treatment, seven fragments of 1D electrophoretical profile from control, after two or 72 h under stress condition were excised, digested with trypsin and analyzed via mass spectrometry. In treatment with water deficit, six fragments of 1D electrophoretical profile from control or stressed samples, as well as 14 *spots* differentially expressed between 2D profiles, were also analyzed via mass spectrometry. Putatively, more than 35 proteins were identified, categorized in processes of energy production, carbohydrate metabolism and defense responses to abiotic stresses. The profiling of identified peptides suggests the existence of physiological adjustment mechanisms towards tolerance for the studied stressing factors. Such proteins may be candidates to future investigations regarding structural and functional characterization in strategies for selection and breeding to improve tolerance against water deficit and salinity in physic nut.

Key-words: abiotic stress, peptide, chloroplast.

Lista de Figuras

Figura 1. Imagens do experimento de pinhão-mansó sob condições de salinidade e déficit hídrico em casa de vegetação. A) Seleção das sementes em função do tamanho. B) Plantio das sementes em bandejas com areia. C) Plantas com 14 dias após a germinação. D) Aferição do tamanho das plantas a serem transplantadas. E) Transplântio das plantas para vasos de polietileno. F) Visão geral do experimento..... 19

Figura 2. Imagem representativa do experimento de pinhão-mansó sob condições de déficit hídrico. 21

Figura 3. Imagem representativa do experimento de pinhão-mansó sob condições de salinidade. 22

Figura 4. Valores médios de percentuais de: A) Clorofila *a*. B) Clorofila *b*. C) Clorofila total. D) Carotenoides em pinhão-mansó, sob estresse salino, cultivadas em areia lavada em casa de vegetação, após 2 e 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl, tendo como parâmetro o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras comuns nas duas condições não diferem entre si, estatisticamente. 35

Figura 5. Valores médios de dados fisiológicos de pinhão-mansó sob condições de salinidade: A) Danos na membrana celular. B) Teor relativo de água. C) Potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}). D) Transpiração foliar (E). E) Fotossíntese líquida (A). F) Condutância estomática (gs) em pinhão-mansó sob estresse salino, cultivadas em areia lavada em casa de vegetação, após 2 e 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl, tendo como parâmetro o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras comuns nas duas condições não diferem entre si, estatisticamente. 37

Figura 6. Valores médios de dados fisiológicos de pinhão-mansó em condições de déficit hídrico A) Fotossíntese líquida (A). B) Transpiração foliar. C) Condutância estomática (gs) em pinhão-mansó, cultivados em casa de vegetação do 1º ao 5º dia de estresse hídrico..... 39

Figura 7. Valores médios dos dados fisiológicos de pinhão-mansó sob condições de déficit hídrico: A) Potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}). B) Teor relativo de água (TRA) em plantas de pinhão-mansó cultivados em casa de vegetação após o 5º dia em condições de déficit hídrico, tendo como parâmetro o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras comuns nas duas condições não diferem entre si, estatisticamente. 40

Figura 8. Valores médios dos teores de: A) Clorofila *a*. B) Clorofila *b*. C) Clorofila total e D) Carotenoides em plantas de pinhão-mansó cultivados em casa de vegetação após o 5º dia em condições de déficit hídrico, tendo como parâmetro o teste de Tukey a 5% de probabilidade, letras comuns nas duas condições não diferem entre si, estatisticamente..... 41

Figura 9. Imagens das amostras ricas em cloroplastos, visualizadas no microscópio. A) Após a segunda centrifugação, ainda com fragmentos celulares. B) Após a etapa do gradiente de sacarose. 42

Figura 10. Localização dos fragmentos excisados do gel SDS-PAGE (1D) de cloroplastos de pinhão-mansó submetidos a 2 e 72 h de estresse salino para análise no espectrômetro de massas (MM: Marcador Molecular; CS: Controle Salino; EH: Estresse Salino; 1-29: Numeração dos fragmentos do gel). 44

Figura 11. Localização dos fragmentos excisados do gel SDS-PAGE (1D) de cloroplastos de pinhão-mansó submetido a estresse hídrico para análise no espectrômetro de massas (MM: Marcador Molecular; CH: Controle Hídrico; EH: Estresse Hídrico; 1-12: Numeração dos fragmentos do gel). 44

Figura 12. Anotação ontológica dos peptídeos identificados em plantas de pinhão-mansó submetidas a estresse salino nos períodos de 2 e 72 h utilizando a ferramenta Gene Ontology (GO) da base de dados UNIPROT.....	45
Figura 13. Anotação ontológicas dos peptídeos identificados em plantas de pinhão-mansó submetidas a estresse hídrico utilizando a ferramenta Gene Ontology da base de dados UNIPROT.	46
Figura 14. Análise comparativa entre os géis de amostras cloroplastidiais de pinhão-mansó sob estresse hídrico, cultivadas em casa de vegetação.....	48
Figura 15. Distribuição dos peptídeos diferencialmente expressos em pinhão-mansó na condição de déficit hídrico de acordo com sua anotação no GO.....	49
Figura 16. Representação esquemática da expressão de proteínas em pinhão-mansó sob salinidade cultivada em casa de vegetação.....	73
Figura 17. Representação esquemática da expressão de proteínas em pinhão-mansó sob déficit hídrico cultivada em casa de vegetação.....	80

Lista de Tabelas

Tabela 1. Anotação presumível dos peptídeos detectados em secções de SDS-PAGE (1D) de amostras submetidas ou não à condição de estresse por salinidade, após 2 h do início do estresse, contra bancos de dados de proteínas de espécies vegetais (M: Mascot; U: Uniprot; G: NCBI; ns: sem similaridade significativa)..... 51

Tabela 2. Anotação presumível dos peptídeos detectados em secções de SDS-PAGE (1D) de amostras submetidas ou não à condição de estresse por salinidade, após 72 h do início do estresse, contra bancos de dados de proteínas de espécies vegetais (M: Mascot; U: Uniprot; G: NCBI; ns: sem similaridade significativa)..... 54

Tabela 3. Anotação presumível dos peptídeos detectados em secções de SDS-PAGE (1D) de amostras submetidas ou não à condição de estresse por déficit hídrico, após 5 dias do início do estresse, contra bancos de dados de proteínas de espécies vegetais (M: Mascot; U: Uniprot; G: NCBI; ns: sem similaridade significativa)..... 58

Tabela 4. Anotação presumível dos peptídeos (spots) detectados em 2D-PAGE/MS, selecionados com variação significativa entre amostras submetidas ou não à condição de estresse por déficit hídrico, após 5 dias do início do estresse, contra bancos de dados de proteínas de espécies vegetais (M: Mascot; U: Uniprot; G: NCBI; ns: sem similaridade significativa). (*) Ratio EH/C: razão de variação na %Vol do spot na amostra sob estresse hídrico em relação à amostra controle. 61

Tabela 5. Anotação presumível dos peptídeos (spots) detectados em 2D-PAGE/MS, selecionados como exclusivos de amostras não submetidas à condição de estresse por déficit hídrico (controle), após 5 dias do início do estresse, contra bancos de dados de proteínas de espécies vegetais (M: Mascot;

U: Uniprot; G: NCBI; ns: sem similaridade significativa). (*) Ratio EH/C: razão de variação na %Vol do spot na amostra sob estresse hídrico em relação à amostra controle. 62

Tabela 6. Anotação presumível dos peptídeos (spots) detectados em 2D-PAGE/MS, selecionados como exclusivos de amostras submetidas à condição de estresse por déficit hídrico, após 5 dias do início do estresse, contra bancos de dados de proteínas de espécies vegetais (M: Mascot; U: Uniprot; G: NCBI; ns: sem similaridade significativa). (*) Ratio EH/C: razão de variação na %Vol do spot na amostra sob estresse hídrico em relação à amostra controle. 63

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Sigla	Definição
%Vol	Porcentagem de volume do <i>spot</i> normalizado em gel
Ψ_{wf}	Potencial hídrico foliar
2D-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional
A	Fotossíntese líquida
ABA	Ácido abscísico
ACP	Proteínas carregadoras de acil
BC	Biotina carboxilase
BCCP	Proteína transportadora de biotina-carboxil
BSA	Albumina de soro bovino
CETENE	Centro de Tecnologia do Nordeste
CE	Condutividade elétrica
CHAPS	Cloroamidopropil dimetilamônio propano sulfonato
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	Capacidade de pote
CS	Controle salino

CT	Carboxi transferase
DEP's	Peptídeos diferencialmente expressos
DM	Danos na membrana
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
FAZ	Sintases de ácidos graxos
E	Transpiração
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EH	Estresse Salino
GO	Gene Ontology
gs	Condutância estomática
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IAA	Iodoacetamida
IEF	Focalização isoeletrica
IPG	pH imobilizado em gradiente
MM	Massa molecular
MS	Espectrometria de massas

m/z	Relação massa/carga
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
Ns	Sem similaridade significativa
O ₂	Oxigênio singlete
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
OH [•]	Radical hidroxilo
pI	Ponto isoelétrico
PSI	Fotossistema I
PMF	Peso da massa fresca
PMS	Peso da massa seca
PMT	Peso da massa túrgida
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
Ratio EH/C	Razão de variação na % Vol. do <i>spot</i> na amostra sob estresse hídrico em relação à amostra controle
RuBisCO	Ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio
TAG	Triacilgliceróis

TNT	Tecido não tecido
TRA	Teor relativo de água
VE	Vazamento de eletrólitos

Sumário

Resumo	VII
Abstract.....	VIII
Lista de Figuras	IX
Lista de Tabelas	XII
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	XIV
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1 Pinhão-Manso.....	4
2.1.1 Origem do Óleo Extraído da <i>Jatropha curcas</i> L.....	4
2.1.2 Importância Econômica da <i>J. curcas</i>	5
2.2 Estresse Abióticos em Plantas	7
2.2.1 Déficit Hídrico.....	9
2.2.2 Estresse Salino	11
2.2.3 Salinidade e Déficit Hídrico Associados aos Mecanismos Moleculares	12
2.3 Utilizações da Tecnologia Proteômica no Estudo Planta X Estresses Abióticos.....	14
3. Objetivos	16
3.1 Objetivo Geral.....	16
3.2 Objetivos Específicos.....	16
4. Materiais e Métodos	17
4.1 Material Vegetal.....	17
4.1.1 Tratamentos	17
4.1.1.1 Tratamento Hídrico.....	20
4.1.1.2 Tratamento salino.....	21
4.2 Análises Fisiológicas.....	22
4.2.1 Clorofila <i>a</i> , Clorofila <i>b</i> , Clorofila Total e Carotenoides.....	22
4.2.2 Danos na Membrana.....	23
4.2.3 Potencial Hídrico Foliar (Ψ_{wf})	23
4.2.4 Teor Relativo de Água	24
4.2.5 Fotossíntese, Transpiração, Condutância Estomática e Concentração Interna de CO ₂	24

4.2.6 Análise Estatística	24
4.3 Análise Proteômica.....	24
4.3.1 Testes de Protocolos para Obtenção de Cloroplastos de Pinhão-Manso	25
4.3.2 Extração e Quantificação de Proteínas Totais Cloroplastidiais	28
4.3.2 Eletroforese SDS-PAGE (1D)	29
4.3.3 Eletroforese Bidimensional (2D-PAGE)	29
4.3.3.1 Focalização Isoelétrica (IEF) – 1ª Dimensão	30
4.3.3.2 Eletroforese 2D-PAGE – 2ª Dimensão	30
4.3.3.3 Visualização das Proteínas.....	31
4.3.3.4 Obtenção e Análise das Imagens.....	31
4.3.3.5 Tripsinização e Sequenciamento de Peptídeos	32
4.3.4 Fragmentação (MS) e Sequenciamento das Proteínas	33
4.3.5 Identificação das Proteínas.....	33
5. Resultados	34
5.1 Análises Fisiológicas (Experimento em Condições de Salinidade)	34
5.1.1 Clorofila <i>a</i> , Clorofila <i>b</i> , Clorofila Total e Carotenoides.....	34
5.1.2 Relações Hídricas e Trocas Gasosas	36
5.2 Análises Fisiológicas (Experimento em Condições de Déficit Hídrico).....	38
5.2.1 Trocas Gasosas (Fotossíntese (<i>A</i>), Transpiração (<i>E</i>) e Condutância Estomática (<i>gs</i>)).....	38
5.2.2 Relações Hídricas (Potencial Hídrico Foliar (Ψ_{wf}) e Teor Relativo de Água (TRA)).....	40
5.2.3 Clorofila <i>a</i> , Clorofila <i>b</i> , Clorofila Total e Carotenoides	41
5.3 Análise Proteômica.....	42
5.3.1 Testes de Protocolos para Purificação de Cloroplasto e Extração de Proteínas de Cloroplastos	42
5.3.2 Análise do Gel SDS-PAGE	43
5.3.3 Análise do Gel 2D	46
5.3.4 Anotação Presumível dos Peptídeos em Condições de Déficit Hídrico e Salinidade.....	50
6. Discussão	64
6.1 Estresse Salino	64
6.2. Estresse Hídrico.....	74
7. Conclusões	81

8. Referências	82
9. Curriculum Vitae (LATTES)	92

1. Introdução

O aumento excessivo dos gases na atmosfera com o efeito estufa e o aquecimento global, assim como o aumento da demanda de combustíveis para utilização em transportes e a diminuição das reservas de combustíveis fósseis embasa a importância e o interesse na busca por novas fontes de energia alternativas.

Os biocombustíveis renováveis são derivados de biomassa vegetal renovável, poluem menos, e podem substituir os combustíveis fósseis. Atualmente, são obtidos a partir de qualquer matéria-prima à base de hidratos de carbono (açúcares, amido, celulose), ou à base de óleo. O biodiesel é produzido a partir de óleos vegetais, oriundos de culturas agrícolas, como: soja, canola, girassol e amendoim.

Para a produção sustentável de biocombustíveis, tem-se procurado culturas com alto rendimento e que não gerem competição com insumos alimentares, em particular o biodiesel, com a introdução de espécies mais promissoras, como a *Jatropha curcas* L., que tem na semente alto teor de óleo com características físico-químicas relativamente similares às do diesel fóssil.

Jatropha curcas, popularmente chamada de pinhão-mansão, é encontrada nas regiões tropicais e subtropicais da América e do Sul da Ásia. Além de ser uma planta cujo óleo das sementes é utilizado como matéria-prima do biodiesel, é também uma fonte de produtos medicinais, pesticidas biológicos, e para a conservação e recuperação de solos erodidos.

Apesar de possuir múltiplas utilidades, o fator de maior importância na cultura de pinhão-mansão é a produção de ácidos graxos e triacilgliceróis,

sintetizados primariamente nos cloroplastos, organela responsável principalmente pela fotossíntese. Esse é um dos processos mais importantes da natureza, convertendo energia luminosa em energia química, proveniente da fixação de dióxido de carbono e produzindo oxigênio (Tikhonov, 2013). Estudos nesse processo são primordiais para entender a funcionalidade adequada do cloroplasto, uma vez que a descrição de distúrbios funcionais no processo de fotossíntese podem elucidar mecanismos para o melhoramento, e conseqüentemente para o aumento da produção de óleo, visto que o processo inicial para síntese dos ácidos graxos ocorre nos cloroplastos. Tais distúrbios são causados por flutuações nas condições ambientais, por exemplo, temperatura ou disponibilidade de água (Pfalz *et al.*, 2012).

Sabe-se que as sementes de pinhão-mansão possuem alto teor de óleo. No entanto, para que a planta apresente um bom desenvolvimento e rendimento, são necessárias condições edafoclimáticas favoráveis, concomitantemente à aplicação de tecnologias para aumentar a produtividade. A viabilidade deste cultivo ainda depende do desenvolvimento de tecnologia agrônômica e do cultivo para obtenção de altas produtividades nas diferentes regiões do Brasil (Freitas *et al.*, 2011; Laviola *et al.*, 2012)

Alguns dos fatores que limitam o crescimento, desenvolvimento e produtividade das culturas são a salinidade e a escassez de água. A salinidade nos solos pode alcançar níveis prejudiciais às plantas e os danos podem atingir vários graus de severidade. O excesso de sais por um longo período pode causar danos por toxicidade, quando não exportados, secretados ou compartimentalizados adequadamente (Fricke *et al.*, 2006). Quando a planta está sob déficit hídrico, por sua vez, existe um antagonismo entre a manutenção da

água pela planta e a taxa de assimilação de CO₂, visto que uma das primeiras respostas para evitar a perda de água é o fechamento dos estômatos e consequentemente diminui a taxa de fixação de CO₂, assim reduzindo drasticamente a produção de carboidratos e outras moléculas reduzidas como os ácidos graxos. As respostas metabólicas e fisiológicas a tais fatores de estresse acontecem em virtude das plantas captarem sinais e ativarem vias de transdução.

Essas podem ativar mecanismos de alteração na regulação da expressão gênica em nível genômico, transcricional e/ou traducional. Em geral, resultam em mudanças em rotas metabólicas e em processos fisiológicos específicos associados à maior ou menor tolerância ao fator de estresse.

Como as proteínas são geralmente moléculas diretamente receptoras dos sinais ambientais e efetoras dos mecanismos de resposta ao ambiente e consequentemente ao estresse, além de estarem mais próximas da resposta fenotípica, justifica-se a importância do estudo proteômico de plantas submetidas a estresse salino e hídrico. A análise proteômica cloroplastidial permite o estudo em larga escala da expressão gênica no nível traducional e pós-traducional da organela responsável pela síntese primária dos lipídios.

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho identificar peptídeos cloroplastidiais diferencialmente expressos em plantas de pinhão-mansão submetidas ao estresse hídrico e salino e que estejam potencialmente associados aos mecanismos de resposta associados à fisiologia desta cultura.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Pinhão-Manso

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), espécie perene nativa da América tropical e Ásia, pertence à Classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Euphorbiales e família *Euphorbiaceae* (Liu *et al.*, 2013). Apresenta hábito arbustivo e produz sementes com alto teor de óleo.

O nome *J. curcas* tem origem grega, “jatos” (doutor) e “trophé” alimento, sugerindo significado para o uso medicinal. Entretanto, devido à toxicidade nas folhas, estas não são utilizadas para alimentação. A principal forma de aplicação do pinhão-manso é pela utilização do óleo extraído das sementes o qual é utilizado desde a fabricação de sabão e aplicações medicinais (Jongschaap, 2007) até a produção de biodiesel.

2.1.1 Origem do Óleo Extraído da *Jatropha curcas* L.

Os triacilgliceróis são os maiores componentes das sementes oleaginosas (Yen *et al.*, 2008) e são inicialmente formados nos cloroplastos, a partir de ácidos graxos precursores. Os triacilgliceróis são moléculas constituídas de um glicerol esterificado e três ácidos graxos. A síntese de ácidos graxos nas plantas ocorre no interior dos cloroplastos. São nestas organelas onde ocorrem os processos essenciais e interdependentes da fotossíntese, biossíntese de ácidos graxos e aminoácidos, dentre outras vias de metabolismo secundário (Hörmann *et al.*, 2007).

Os ácidos graxos são sintetizados por um complexo proteico multifuncional, onde diferentes enzimas são ligadas covalentemente, principalmente as sintases de ácidos graxos (FAS) e acetil- CoA carboxilase (ACCase). As ACCases são responsáveis pela carboxilação do acetil- CoA, substrato inicial da síntese de ácido graxos, formando o malonil- CoA. As enzimas da sintase de ácidos graxos catalisam o crescimento da cadeia carbônica adicionando carbonos provenientes da acetil- CoA até atingir 18 carbonos. O alongamento da cadeia de ácidos graxos é dependente da proteína carregadora de acil (ACP) (Somerville *et al.*, 2000). Que depois são exportados para o retículo endoplasmático para serem convertidos em moléculas de triacilgliceróis e destinados a sementes.

O óleo da semente de pinhão-manso é extraído das sementes e, assim como na maioria das plantas oleaginosas, triacilgliceróis (TAG) são armazenados no citoplasma das células do endosperma, em organelas chamadas de oleossomos (Taiz and Zeiger, 2009). Ressalta-se ainda que os produtos da fotossíntese e a disponibilidade de agentes fortemente redutores (NADPH) são utilizados para a produção de ácidos graxos, assim como outros metabólitos importados do citossol e de outras organelas podem servir para síntese de ácidos graxos nos cloroplastos (Taiz and Zeiger, 2009).

2.1.2 Importância Econômica da *J. curcas*

O óleo extraído de *J. curcas* tem diversas aplicações industriais, tais como a produção de cosméticos, em que se utilizam alguns dos subprodutos da produção do biodiesel (Kaushik *et al.*, 2007). A planta de pinhão-manso também é usada com grande potencial para fitorremediação de metais pesados (Jamil *et al.*, 2009).

Na região do oeste africano, as folhas de *J. curcas* são usadas em diferentes formas para curar várias doenças, como: febre, infecções na boca, e reumatismo articular (Aiyelaagbe, 2011). Adicionalmente, o extrato foliar é utilizado como estratégia terapêutica no tratamento de leishmaniose na Guiana Francesa (Odonne, 2011). Recentemente, o extrato da raiz tem reduzido o crescimento de células tumorais *in vitro*, em ratos, demonstrando que possui uma atividade citotóxica forte, ressaltando que o extrato da planta é candidato a droga anticâncer (Aiyelaagbe, 2011).

Além das aplicações citadas, o óleo de extraído da semente de *J. curcas* é bastante utilizado para a produção de biodiesel. No Brasil, em 2004, foi criado o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), que é um programa interministerial do Governo Federal objetivando a implementação, de forma sustentável, da produção e uso do Biodiesel, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento regional, apoiando a crescente demanda por combustíveis de fontes renováveis gerando empregos e renda na agricultura familiar, como também reduzindo disparidades regionais. Usando a estratégia de mercado, o governo criou a Lei nº 11097, incentivando a introdução de biodiesel a matriz energética do Brasil, inicialmente a utilização era opcional de B2, 2% de biodiesel e 98% de diesel derivado do petróleo. Em 2008, tornou-se obrigatório a mistura do biodiesel ao diesel de petróleo, em proporções crescentes nos próximos anos. E desde 2010, o teor de biodiesel a ser adicionado ao óleo diesel é de 5%, em volume na mistura com óleo diesel, assim aumentando a demanda do biodiesel no Brasil (ANP, 2012).

O pinhão-mansão tem sido considerado como uma fonte alternativa de matéria-prima no Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel. Essa

escolha baseia-se no alto rendimento de óleo gerado por área de cultivo, baixo custo de produção e por ser tolerante a seca, sendo esta última vantagem significativa principalmente em regiões semiáridas do país com condições edafoclimáticas adversas (Beltrão *et al.*, 2007).

O consumo interno de óleo diesel no Brasil é da ordem de 40 bilhões de litros por ano, sendo 80,3% utilizados em transportes, 16,3% consumidos pela agricultura e 3,4% pela indústria e outros setores. Contudo, o potencial de utilização do biodiesel ainda se mantém pouco explorado, diferente de outros países que atuam nesse sentido em grande escala (Rodrigues, 2006).

2.2 Estresse Abióticos em Plantas

As plantas estão sujeitas a estresses bióticos e abióticos. Estresses bióticos compreendem aqueles causados por insetos, bactérias, fungos e vírus, enquanto que nos abióticos as plantas estão expostas a estresses ambientais tais como mudanças de temperatura e umidade relativa do ar, radiação solar, deficiência hídrica ou mineral e salinidade no solo (Taiz and Zeiger, 2009). Estas condições de estresse são um desvio significativo das condições ótimas para a vida, e induzem mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis a princípio, mas podem se tornar permanentes (Larcher *et al.*, 2000).

Os estresses abióticos nas plantas são ocasionados por condições edafoclimáticas em virtude de não poderem evitar condições ambientais adversas, devido à sua natureza sésil. Esta condição exige que a planta aclimate-se, produzindo metabólitos através da alteração da expressão gênica. Esses fatores de estresse abióticos são uma ameaça para as plantas, impedindo-

as de alcançar seu potencial genético completo e produtividade de culturas de limite em todo o mundo (Krishania *et al.*, 2013).

Para sobreviver, os vegetais desenvolveram durante a evolução alguns mecanismos de defesa, produzindo metabolitos através da alteração da expressão gênica, que podem ser classificadas como estruturais, baseadas em características anatômicas (pêlos, espinhos, tricomas e ceras); e químicas, quando relacionadas a compostos biologicamente ativos de massa molecular variada (aminoácidos não proteicos, alcaloides e proteínas).

Os estresses abióticos em plantas também causam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que ocorre nos cloroplastos, mitocôndria e peroxissomos; a produção de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$); o peróxido de hidrogênio (H_2O_2); o radical hidroxila (OH^{\cdot}), e o oxigênio singleto (O_2). Esses compostos causam a desnaturação de proteínas (Asada, 1999), entre outros danos, como oxidação de lipídios de membranas (Prisco, 1980).

A fotossíntese é o processo metabólico que mais produz ROS nas células vegetais (Miller *et al.*, 2010) e quando não é controlada pelos antioxidantes a fotossíntese pode ser inibida, assim como a atividade de algumas enzimas, pelos danos provocados na estrutura de proteínas (Sairam and Saxena, 2000; Hernandez *et al.*, 2000).

Quando as plantas estão sob condições normais de cultivo, neutralizam esses efeitos das ROS, devido à atividade dos antioxidantes, entretanto quando a produção dos antioxidantes não é suficiente para neutralizar as ROS, as plantas sofrem com estresse oxidativo, simultaneamente, quando submetidas a outros estresses abióticos (Scandalios, 2002).

2.2.1 Déficit Hídrico

A diminuição da disponibilidade de água é um dos fatores ambientais mais importantes na regulação do crescimento e do desenvolvimento das plantas. Quando expostas a esse estresse, apresentam várias formas e estratégias para superar as limitações impostas pelo ambiente, produzindo mecanismos de adaptação ou aclimatação para sobreviver, como: fechamento dos estômatos, produção de folhas menores, redução na área foliar, ajuste osmótico e aumento da profundidade das raízes.

Com a diminuição do conteúdo de água na planta, as células vegetais contraem, devido ao decréscimo de volume celular e ao decréscimo na pressão de turgor que causa uma diminuição na taxa de crescimento. Influenciando a concentração de solutos nas células e que estão envolvidos no processo de ajuste osmótico, tais como a prolina, um aminoácido osmoprotetor particularmente sensível ao estresse (Larcher *et al.*, 2000). Os osmoprotetores reduzem o potencial hídrico, ajudando assim a manter o movimento de água para as folhas e, conseqüentemente, favorecendo a turgescência das mesmas (Hopkins, 1995).

As plantas precisam fixar o CO₂ para realizar a fotossíntese, mas perdem água pela folha majoritariamente nos estômatos, estruturas com grau de abertura e fechamento morfo-fisiologicamente regulável para controle da disponibilidade de CO₂ e transpiração. A abertura estomática regula a saída de vapor de água juntamente com a entrada de CO₂, para viabilizar a fotossíntese, entretanto quando planta está sob estresse hídrico a fotossíntese tende a decrescer, assim como o potencial hídrico das células-guarda que induz o fechamento dos estômatos.

O mecanismo de regulação estomática depende tanto do CO₂, quanto do vapor de água e das variações de turgescência das células vegetais foliar. Esta regulação ainda é controlada pelo ácido abscísico (ABA), principal hormônio envolvido no fechamento dos estômatos, sintetizado continuamente em baixas taxas nas células dos mesófilos. Entretanto o ABA tem uma dupla função diante ao estresse hídrico: um curto prazo reduz a transpiração e em longo prazo que induz a síntese de proteínas que aumentam a tolerância das plantas à dessecação (Taiz and Zeiger, 2009).

A redução da taxa de assimilação de CO₂ durante o estresse hídrico deve-se à redução da disponibilidade de CO₂ no interior da folha, causada pelo fechamento dos estômatos em resposta a redução da disponibilidade de água no solo (Rosa *et al.*, 1991). A deficiência hídrica altera desde a fotossíntese até a síntese proteica, de ácidos graxos e acúmulo de solutos.

Dentre as respostas mais comuns em plantas, incluindo pinhão-mansão, estão a disfunção do transporte de elétrons nos tilacoides, danos às clorofilas, diminuição dos sistemas antioxidantes, maior produção de H₂O₂ e outras espécies reativas de oxigênio, peroxidação de lipídeos e redução da fotossíntese (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Silva *et al.*, 2010). Como consequência, podem ser observadas a redução no crescimento da parte aérea e a diminuição na demanda de fotoassimilados, que podem ser alocados na parte subterrânea, favorecendo o crescimento de raízes na busca de locais mais úmidos do solo (Taiz and Zeiger, 2009).

2.2.2 Estresse Salino

O estresse salino é caracterizado pelo excesso de íons no do solo, que se dá pelo acúmulo predominantemente dos íons, tais como: Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CO_3^{2-} , BO_3^- e NO_3^- (Epstein and Bloom, 2006; Ferreira *et al.*, 2010), prejudicando expressivamente a produtividade das plantas cultivadas (Munns and Tester, 2008).

A salinidade dos solos pode ser de origem natural (regime pluvial e da alta evaporação) ou antropogênicas. Dentre as antropogênicas, as principais causas são a irrigação com alta concentração de solutos ou mesmo a evaporação, que geram a incorporação de sais aos solos acompanhado de uma deficiência no sistema de drenagem na área agricultáveis, permitindo o acúmulo de íons na superfície do solo e depósito na zona do sistema radicular.

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, 2001; Lauchli and Grattan, 2007).

Várias alterações nas células vegetais, quando submetidas ao estresse salino, foram descritas, tais como: a diminuição da fotossíntese e consequentemente a menor disponibilidade de carboidratos, substratos necessários para o crescimento do vegetal; a redução no teor de proteínas, devido ao aumento da proteólise (Parida and Das, 2005; Silveira *et al.*, 2003); e metabolismo de lipídios em função da maior intensidade de oxidação. Tais processos afetam a área foliar e a taxa de crescimento das plantas, pois a salinidade aumenta o gasto de energia metabólica para absorção de água pelas

raízes para realizar os ajustes bioquímicos necessários à sobrevivência sob estresse, portanto desviando a energia do crescimento e dos processos produtivos (Rhoades *et al.*, 2000).

Na literatura, algumas estratégias adaptativas são utilizadas pelos organismos vegetais ao estresse salino, como: retenção de íons em raízes ou mesmo o sequestro de íons tóxicos em vacúolos celulares (Munns, 2002). Assim, evitando níveis tóxicos no aparato fotossintético, redução da área foliar, trazendo economia de água (Oliveira *et al.*, 2007), ajuste osmótico, através do acúmulo de solutos compatíveis, como prolina e glicina (Bohnert *et al.*, 1999).

É possível que a tolerância à salinidade envolva adaptações nas membranas que afetam a permeabilidade e facilitam o transporte de íons, contudo a resposta das plantas à salinidade depende de vários fatores, como o estágio fisiológico no qual é aplicado o estresse, a intensidade e duração, e sobretudo, o genótipo utilizado (Silveira *et al.*, 2001).

2.2.3 Salinidade e Déficit Hídrico Associados aos Mecanismos Moleculares

Os recentes avanços científicos e tecnológicos verificados a partir das pesquisas genéticas de diversas espécies vegetais têm mostrado que as plantas respondem ao estresse hídrico e à salinidade com alterações fisiológicas e metabólicas para maior tolerância, de acordo com os genes que possui e principalmente com a maneira com que estes genes são ativados (Araújo *et al.*, 2005).

A tolerância a tais estresses em plantas decorre da síntese e ativação de proteínas, com funções específicas, tais como: rápida percepção e transmissão de sinais ambientais; proteção às membranas, as enzimas e ao DNA das células;

aumento na capacidade de absorção de água do solo; e redução na perda de água por transpiração (Benko-Iseppon *et al.*, 2005). Quando submetidas aos estresses hídrico e salino, os problemas são detectados pela planta por mecanismos sensores e de transdução de sinais.

A resposta a ativação de fatores transcricionais por déficit hídrico leva a ativação de uma série de mecanismos de resposta ao estresse, responsáveis por conferir a tolerância. Entre os mecanismos que são regulados estão os mecanismos de: movimento de água (aquaporinas), as chaperonas (Hsp) e o de osmoproteção (prolina) (Maurel *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2007).

Em resposta à salinidade, diversas proteínas têm sido identificadas com acúmulo diferencial através de análise proteômica e anotação associada a proteínas de membrana, receptores e quinases, cuja regulação é conhecidamente responsiva a outros estresses tais como frio, seca e tratamento ácido abscísico (Cheng *et al.*, 2009). Especificamente em pinhão-mansão, o estresse por seca associado a altas temperaturas altera significativamente os mecanismos de proteção contra espécies reativas de oxigênio e reduz a capacidade fotossintética devido a danos nas membranas celulares (Silva *et al.*, 2010). Várias enzimas do metabolismo oxidativo (superóxido-dismutase, ascorbato peroxidase, catalase) mostraram-se altamente responsivas à seca, calor e a ambas as condições associadas.

Desta forma, torna-se relevante investigar quais variações moleculares no conjunto de proteínas e peptídeos cloroplastidiais, direta ou indiretamente associados à biossíntese de ácidos graxos, ocorrem em plantas de pinhão-mansão submetidas a estresses abióticos pertinentes às condições de cultivo tais como o déficit hídrico e a salinidade do solo.

2.3 Utilizações da Tecnologia Proteômica no Estudo Planta X Estresses

Abióticos

A proteômica estuda o conjunto de proteínas sintetizadas por uma célula ou conjunto de células em um estágio de desenvolvimento ou condições ambientais específicas definidas. A caracterização geral do proteoma com identificação do maior número possível de proteínas ou daquelas proteínas diferencialmente expressas entre duas amostras contrastantes é um procedimento que pode ser adotado para identificação de proteínas cloroplastidiais de pinhão-mansão associadas com respostas ao estresse hídrico e salino. Em virtude de esta organela ser o sítio primário da síntese de ácidos graxos e alguns glicerolípídeos em *Jatropha* (Ye *et al.*, 2009), síntese de várias enzimas, complexos enzimáticos e de proteínas reguladoras da sua biossíntese.

Análise proteômica de cloroplastos tem sido amplamente utilizada em *Arabidopsis*, permitindo a elaboração de banco de dados para localização subcloroplastidial de proteínas e peptídeos, denominado AT_CHLORO. É composto por 1.323 proteínas identificadas por 10.654 sequências peptídicas distintas, obtidas de cloroplastos purificados e subfrações obtidas de amostras foliares (Ferro *et al.*, 2010). Este banco de dados foi utilizado para comparação da expressão de enzimas específicas de cloroplasto associadas a vias biossintéticas de isoprenóides (Joyard *et al.*, 2009). Outros estudos também foram feitos com plastídios não fotossintéticos de raiz de alfafa, sendo identificadas proteínas associadas a estresses bióticos e abióticos (Daher *et al.*, 2010). Em relação a enzimas do estroma e das membranas do envelope cloroplastidial diretamente participantes do metabolismo de lipídeos, foi verificado por análise proteômica

que os dois principais compartimentos cloroplastidiais desempenham funções majoritárias. No estroma ocorrem as etapas iniciais da biossíntese de ácidos graxos, e nas membranas do envelope concentram a maioria das proteínas responsáveis pelo metabolismo dos glicerolípídeos (Joyard *et al.*, 2010).

Portanto, o conhecimento efetivo de onde, como e quando proteínas são produzidas é essencial para o entendimento dos processos biológicos (Bestel-Corre *et al.*, 2004). Apesar disso, especificamente em pinhão-manso, o conhecimento proteômico é ainda restrito. Já foram realizados estudos comparativos de proteômica diferencial entre tecidos do embrião e endosperma em *J. curcas*.

O proteoma do endosperma na germinação das sementes de pinhão-manso (*J. curcas*) foi publicado (Yang *et al.*, 2009) através de análise e identificação de proteínas envolvidas na mobilização do óleo com a utilização de separação eletroforética 2D e espectrometria de massa. Os resultados mostraram que o início da mobilização de óleo ocorre durante a germinação e posteriormente, o óleo é consumido durante o desenvolvimento inicial da planta. Considerando-se tecidos de embrião e do endosperma, foram identificadas mais de 140 proteínas de expressão não variável e 15 proteínas diferencialmente expressas entre os dois tecidos. Essas foram presumivelmente anotadas como relacionadas ao metabolismo, estresse hídrico, transdução de sinais e estrutura e reservas de óleo. As proteínas do endosperma foram predominantemente: as enzimas relativas ao catabolismo e de reserva, que forneciam nutrição para o embrião em crescimento (Liu *et al.*, 2009).

Além disso, vários estudos (Costa *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011) estão sendo gerados no intuito de isolar e caracterizar

novos genes que estão envolvidos na rota de biossíntese de ácidos graxos, como um começo para produzir plantas transgênicas com o aumento do teor de óleo da *Jatropha*.

Neste contexto, a elucidação da regulação da expressão gênica em pinhão-mansão ligada à seca e salinidade através da investigação do proteoma de cloroplasto, mediante géis e espectrometria de massas, permitirá identificar peptídeos e os respectivos genes codificantes alterados pelo estresse hídrico e 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 cloroplastos de plantas de pinhão-mansão em resposta aos estresses por déficit hídrico e/ou por salinidade.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Otimizar protocolo para extração de peptídeos cloroplastidiais de pinhão-mansão;
- b) Selecionar peptídeos potencialmente produzidos em resposta ao estresse hídrico e/ou salino em cloroplasto de pinhão-mansão.

- c) Identificar peptídeos selecionados e relacioná-los via anotação presumível com proteínas envolvidas em possíveis mecanismos de tolerância ao estresse por déficit hídrico e salinidade em cloroplasto de pinhão-mansão.

4. Materiais e Métodos

4.1 Material Vegetal

As sementes de pinhão-mansão foram gentilmente cedidas pela Universidade Federal de Alagoas (Maceió-AL), selecionadas em função do tamanho e germinadas em bandejas com areia lavada. Após germinação, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e sanidade, e transferidas para vasos de polietileno contendo 15 kg de areia ou substrato comercial, conforme Figura 1.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Laboratório de Fisiologia Vegetal, pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em Recife-PE, no período de outubro a dezembro de 2011.

4.1.1 Tratamentos

As plântulas foram submetidas aos tratamentos hídrico ou salino 60 dias após a germinação. Os vasos continham areia lavada no tratamento salino e

substrato comercial no tratamento hídrico. Em ambos os tratamentos as amostras foram constituídas por folhas coletadas no terço médio superior das plantas. As amostras coletadas foram acondicionadas em tubos de 50 mL (Falcon), imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

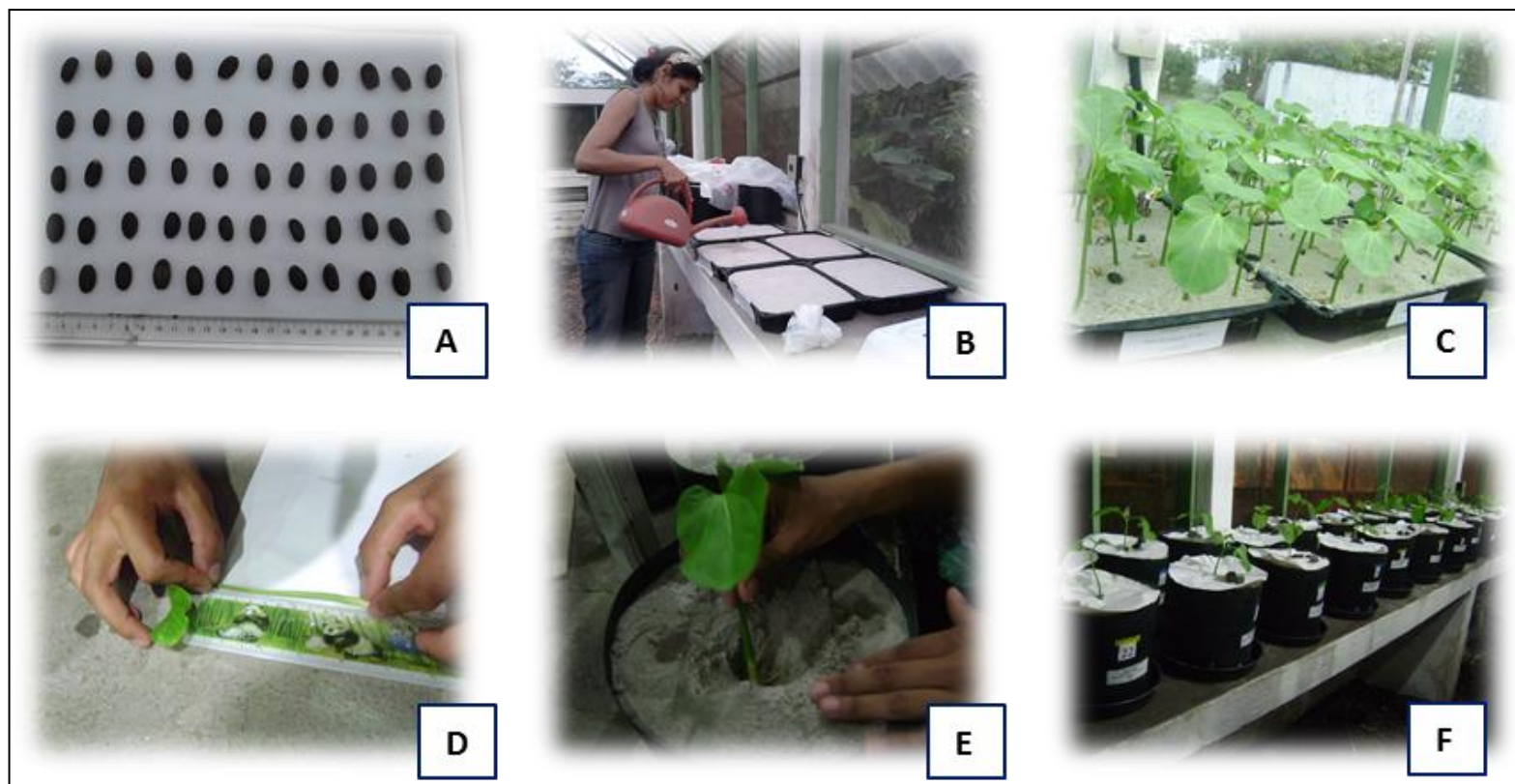


Figura 1. Imagens do experimento de pinhão-mansinho sob condições de salinidade e déficit hídrico em casa de vegetação. A) Seleção das sementes em função do tamanho. B) Plantio das sementes em bandejas com areia. C) Plantas com 14 dias após a germinação. D) Aferição do tamanho das plantas a serem transplantadas. E) Transplantio das plantas para vasos de polietileno. F) Visão geral do experimento.

4.1.1.1 Tratamento Hídrico

Quinze dias após a germinação, as plântulas mais uniformes quanto à altura foram transplantadas para vasos de polietileno contendo cerca de 15 kg de terra vegetal composta. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, que consistiu de dois tratamentos hídricos com supressão de rega e rega diária [100 % da capacidade de pote (CP)], com cinco repetições cada (Figura 2), segundo a metodologia proposta por (Sousa *et al.*, 2000). As plantas foram regadas diariamente e a capacidade de pote foi adotada como o conteúdo de água retida pelo substrato após sofrer saturação e consequente ação da gravidade, até o cessamento da drenagem. A superfície do vaso foi coberta com plástico para evitar a excessiva evaporação da água do solo. Após o período de aclimação (60 dias), foi feita a diferenciação dos tratamentos hídricos até que os estômatos fechassem (cinco dias após o início do estresse), condição para que fosse realizada a coleta. Amostras de folhas de pinhão-mansão foram coletadas para análise de géis 1D e 2D e posterior identificação dos DEP's (peptídeos diferencialmente expressos).

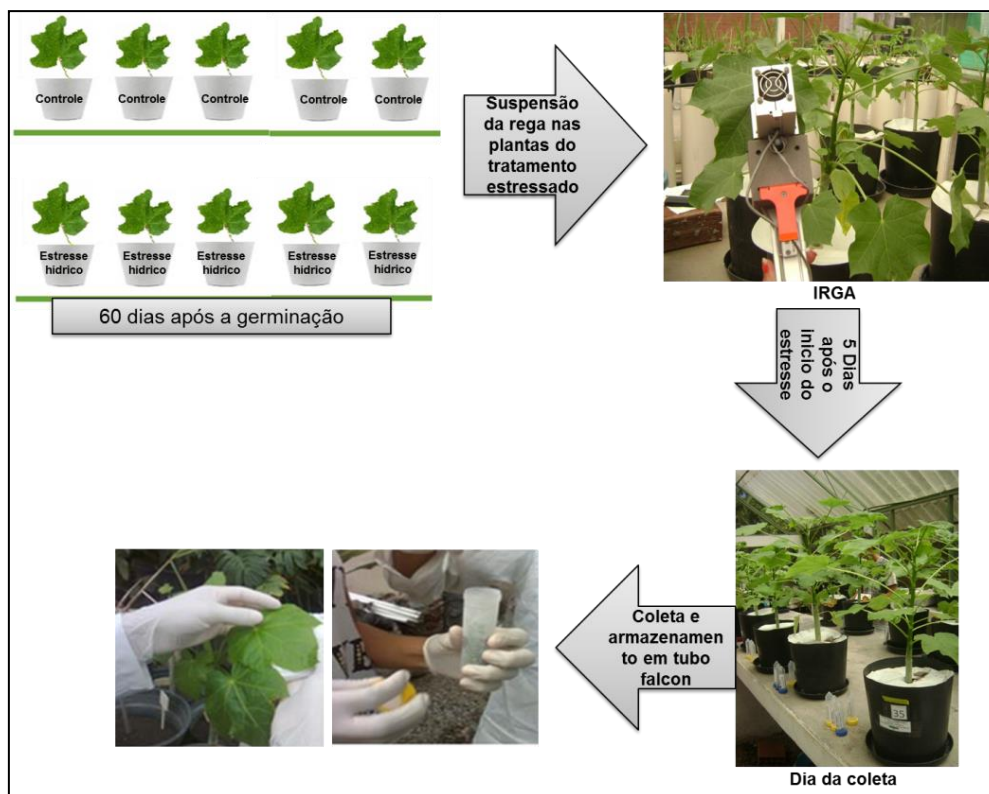


Figura 2. Imagem representativa do experimento de pinhão-mansão sob condições de déficit hídrico.

4.1.1.2 Tratamento salino

As plântulas utilizadas foram transferidas para vasos de polietileno contendo areia previamente lavada para a retirada da matéria orgânica, sendo regada em dias alternados com água de torneira e com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) até a drenagem da rega. As plantas foram mantidas nessa condição por 60 dias e, após esse período, foram expostas ao estresse salino.

Os tratamentos empregados nesse experimento foram: controle solução nutritiva de Hoagland e Arnon) e salino [solução nutritiva contendo 200 mM de NaCl (Hussain *et al.*, 2004)], com quatro repetições cada. Após o período de 2h e 72h amostras controle e sob estresse salino foram coletadas a fim de se obter respostas ao estresse iniciais e tardias respectivamente, Figura 3.

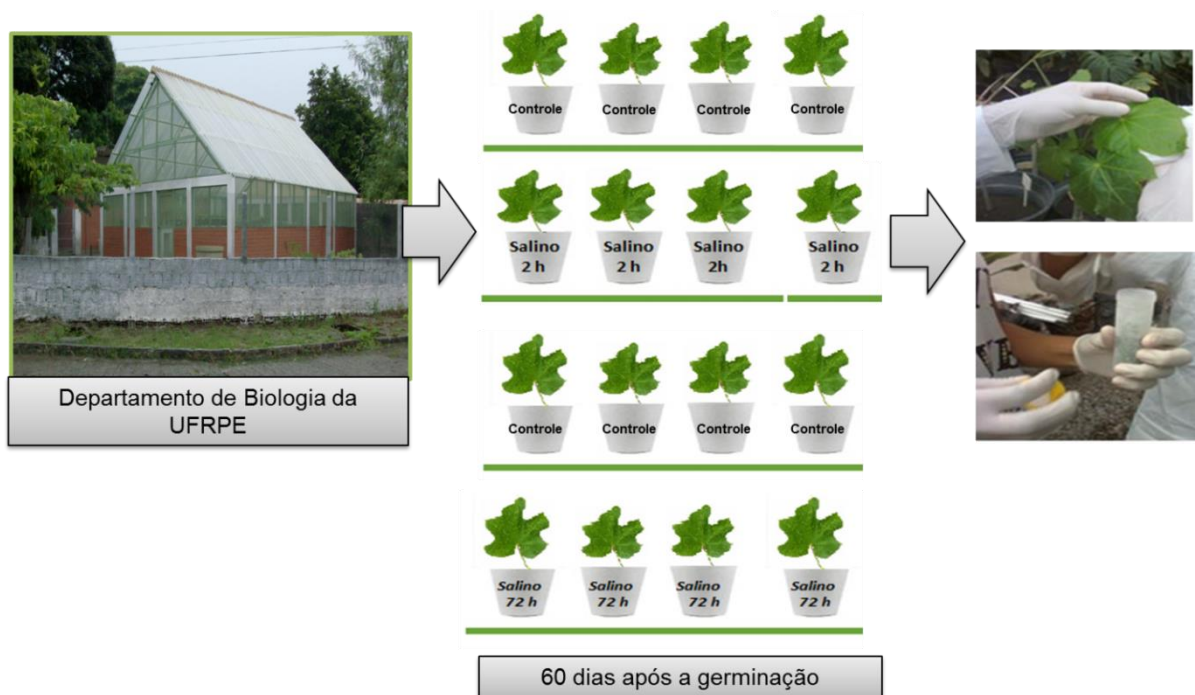


Figura 3. Imagem representativa do experimento de pinhão-mansinho sob condições de salinidade.

4.2 Análises Fisiológicas

4.2.1 Clorofila *a*, Clorofila *b*, Clorofila Total e Carotenoides

A quantificação das clorofilas (*a* e *b*) e carotenoides foi realizada a partir de folhas cortadas em pequenos pedaços em acetona a 80% (v/v), de cada tratamento, conforme o método proposto por Lichtenthaler (1987). O teor de clorofilas e carotenoides foi determinado com base em leituras de absorvância de 663 nm para a clorofila *a*, 645 nm para a clorofila *b*, e a 480 nm para os carotenoides, realizado no espectrofotômetro. Os teores de clorofilas e carotenoides (g kg⁻¹) foram calculados pelas seguintes fórmulas:

$$Chla = [(12,25 \times Abs_{663}) - (2,79 \times Abs_{645})] \times \left[\frac{V}{1000 \times MF} \right]$$

$$Chlb = [(21,5 \times Abs645) - (5,1 \times Abs663)] \times \left[\frac{V}{1000 \times MF} \right]$$

$$Chl\ total = Chla + Chlb$$

$$Car = \left[\frac{[(1000 \times Abs480) - (1,82 \times Chla) - (85,02 \times Chlb)]}{198} \right] \times \left[\frac{V}{1000 \times MF} \right]$$

4.2.2 Danos na Membrana

O grau de integridade das membranas foi estimado pela análise de vazamento de eletrólitos (Alves *et al.*, 2009, com modificações). Foi coletada uma (1) folha por planta, e estas foram cortadas em áreas de 1 cm² (1 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 incubadas em banho-maria a 25°C por 24 h. Após o período de incubação, foi determinada a condutividade elétrica do extrato (C1) com condutímetro, expresso em µS.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 (C2). O percentual de vazamento de eletrólitos foi estimado pela relação: $DM = \left(\frac{C1}{C2} \right) \times 100$.

4.2.3 Potencial Hídrico Foliar (Ψ_{wf})

A determinação do potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}) foi realizada através do uso de câmara de pressão (Scholander *et al.*, 1965), com protocolo padrão.

4.2.4 Teor Relativo de Água

Para o teor relativo de água (TRA), utilizou-se de cinco quadrados de área conhecida da matéria fresca, 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 e deixadas em geladeira por um período de 24 h. Após este período, os quadrados foram novamente pesados para obtenção do peso da massa túrgida (PMT). Por fim, os quadrados foram colocados em estufa, obtendo-se o peso da massa seca (PMS). O TRA foi calculado conforme a fórmula:

$$TRA = \left[\frac{PMF - PMS}{PMT - PMS} \right] \times 100 \text{ conforme Barrs and Weatherley (1962).}$$

4.2.5 Fotossíntese, Transpiração, Condutância Estomática e Concentração Interna de CO₂

As medições de fotossíntese líquida (A), transpiração (E) e condutância estomática (gs) foram realizadas com o analisador portátil de CO₂ a infravermelho (IRGA, ADC modelo LCI Pro, Hoddesdon, UK).

4.2.6 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 (Silva and Azevedo, 2002).

4.3 Análise Proteômica

4.3.1 Testes de Protocolos para Obtenção de Cloroplastos de Pinhão-Mansô

Os protocolos utilizados para isolamento de cloroplastos de pinhão-mansô são descritos a seguir:

Protocolo 1 (Mariac *et al.*, 2000): A amostra foi triturada em nitrogênio líquido e o material vegetal transferido para um tubo com 50 mL com tampão de sorbitol (0,35 M sorbitol, 0,1 M Tris, 5 mM EDTA, pH 7.8) contendo 0,5% de bissufito de sódio. Posteriormente a solução foi filtrada em uma camada de TNT (tecido não tecido). O filtrado foi centrifugado a 4000 x *g* por 25 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. O material sedimentado foi ressuspensionado em 40 mL tampão de sorbitol, sem adição de bisufito de sódio, e centrifugado a 1000 x *g* por 20 min. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado, restando o sedimento enriquecido em cloroplasto.

Protocolo 2 (Triboush *et al.*, 1998): A amostra foi macerada com pistilo e almofariz em 20 mL de solução STE (400 mM sacrose, 50 mM Tris pH 7.8, 20 mM EDTA-Na₂, 0,2% soro bovino albumina, 0,2% β -mercaptoetanol), e em seguida filtrada em uma camada de TNT e centrifugada a 200 x *g* por 20min a 4 °C (descarte os núcleos). O sobrenadante foi recentrifugado a 370 x *g* por 20 min a 4°C e o *pellet* (rico em cloroplasto) coletado.

Protocolo 3 (Van Wijk *et al.*, 2007): A amostra foi macerada em pistilo e cadinho e posteriormente triturada em liquidificador com 50 mL de tampão de trituração [50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 330 mM sorbitol, 2 mM de EDTA-Na₂ (pH 8,0), 5 mM de ácido ascórbico, cisteína 5 mM, 0,05% soro bovino albumina (BSA)] e filtrado em uma camada de TNT. Centrifugou-se o extrato bruto a 1300 x *g* por 3 min a 4° C e descartou-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspensionado em 2 mL tampão de lavagem [50 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 330 mM de sorbitol, 2 mM

de EDTA- Na_2 (pH 8,0)] e, em seguida, a solução foi colocada sobre 13 mL de gradiente de sacarose 50% [50% sacarose, 0,5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 330 mM sorbitol] e 30% [30% sacarose, 0,5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 330 mM sorbitol]. Centrifugou-se a 3750 x g por 10 min a 4°C em um rotor tipo *swing-bucket*, para obtenção da fração cloroplastidial que foi recolhida da interface entre o gradiente de sacarose. A fração cloroplastidial foi transferida para tubo de 2 mL e lavada em 1,5 mL de tampão de lavagem a 1200 x g por 3 min a 4°C seguindo-se de remoção do sobrenadante.

Protocolo 4 (Fan *et al.*, 2009): A amostra foi macerada com pistilo e almofariz em tampão de extração [0,3 M de sorbitol, 1 mM de MgCl_2 , 50 mM de Tris-HCl (pH 7,8), 2 mM EDTA, 0,04% β -mercaptoetanol e 0,1% de polivinilpolipirrolidona]. O homogeneizado foi filtrado em duas camadas de TNT por duas vezes. Depois, o homogeneizado foi centrifugado a 1500 x g, por 10 min a 4°C. Subsequentemente, o *pellet* contendo os cloroplastos foram cuidadosamente ressuspensos em 1 mL de tampão de isolamento [0,3 M de sorbitol, 1 mM de MgCl_2 , 50 mM de Tris-HCl (pH 7,8) e 2 mM EDTA]. O material acima foi então carregado no topo do gradiente de sacarose 13 mL de gradiente de sacarose 50% [50% sacarose, 0,5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 330 mM sorbitol] e 30% [30% sacarose, 0,5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 330 mM sorbitol] e centrifugado a 8000 x g por 20 min a 4°C. Os cloroplastos foram coletados a partir da interfase entre 30 e 50% do gradiente de sacarose, e posteriormente lavados tampão de isolamento.

Protocolo 5 (Molecular Techniques and Methods, 2001): A amostra foi macerada com pistilo e almofariz em 5 mL de solução A [0,35 mM sorbitol, 5 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 0,1%, 0,2% soro bovino albumina e 1% β -

mercaptoetanol]. Em seguida, foi filtrada em uma camada de TNT e centrifugada a 1000 x g por 15 min a 4°C (descarte dos núcleos). O sobrenadante foi recentrifugado a 1000 x g por 15 min a 4°C, e em seguida o sobrenadante foi descartado e ressuspendido em 1 mL de tampão de lavagem [0,35 mM sorbitol, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA]. A solução foi carregada sobre 13 mL de gradiente de sacarose 50% [50% sacarose, 0,5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 330 mM sorbitol] e 30% [30% sacarose, 0,5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 330 mM sorbitol] e centrifugada a 8000 x g por 20 min a 4°C. Em seguida coletou-se a fração cloroplastidial a qual foi lavada com 2 mL de solução de lavagem.

Protocolo 6: Uma folha de pinhão-mansão foi cortada em pedaços pequenos e posteriormente macerada em almofariz com pistilo sob gelo com 20 mL da solução 1 (0,35 M sorbitol, 0,1 Tris, 5 mM EDTA, pH 7,8 e 0,5% de bissulfito de sódio). Após esta maceração, o líquido foi transferido para um liquidificador e acrescentado 30 mL da mesma solução, utilizando cinco pulsos de cinco segundos, para melhor homogeneização e quebra de tecidos que não foram rompidos com maceração. O homogeneizado foi filtrado em uma camada de TNT esterilizado. O resto foliar aderido ao TNT foi novamente macerado com 10 mL da solução 1 gelada e re-filtrado em TNT. A solução esverdeada foi transferida para dois tubos de 50 mL (Falcon) e centrifugadas a 1500 x g, 4°C, por 20 min. O sedimento foi ressuspendido em 2 mL de tampão de lavagem e colocado sobre 13 mL de solução de sacarose 30% [30% sacarose, 0,5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 330 mM sorbitol], quando submetido a outra centrifugação a 2500 x g, 5 min a 4°C. Ao sedimento coletado adicionou-se 2 mL de tampão de lavagem. Os novos tubos foram centrifugados a 100 x g por 5 min a 4°C e, após a

centrifugação coletou-se o sobrenadante que foi transferido para outro tubo de 2 mL, o qual foi novamente centrifugado a 380 x g, por 10 min a 4°C, finalmente coletou-se *pellet* cloroplastidial.

Os padrões e as amostras cloroplastidiais foram analisadas em microscopia ótica visível a 400x para visualização da integridade dos cloroplastos e presença de outras estruturas celulares.

4.3.2 Extração e Quantificação de Proteínas Totais Cloroplastidiais

As proteínas totais das amostras de cloroplastos foram extraídas conforme metodologia Fan *et al.* (2009), com modificações. Adicionou-se 1 mL de tampão de ressuspensão contendo Tris 100 mM, EDTA 100 mM, borato de sódio 50 mM, 50 mM de vitamina C, 1% de Triton X-100, 2% de β -mercaptoetanol ao material rico em cloroplasto e agitada em vortex durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de fenol saturado, e depois as amostras foram colocadas em agitação por 30 min. Em seguida, foram centrifugadas a 15000 x g por 15 min a 4 °C e a fase fenólica foi transferida para outro tubo de 2 mL. Essa etapa foi realizada mais uma vez.

As proteínas foram precipitadas por adição de 1,5 mL sulfato de amônio em metanol e incubadas a 4 °C por 12 h. A solução foi centrifugada 15000 x g por 15 min a 4° C, os sedimentos de proteína foram ressuspensos e lavados com metanol gelado, seguido de acetona gelada três vezes. Depois de cada lavagem, os aglomerados de proteína foram centrifugados a 15000 x g por 15 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente decantado. Finalmente, os *pellets* lavados foram secos ao ar.

As amostras foram ressuspensas em tampão de solubilização contendo ureia e tiourea na proporção 8 M:2 M e em seguida estocadas em ultrafreezer.

A quantificação das proteínas totais foi de acordo com o método de Bradford (1976), que utiliza o Coomassie Brilliant Blue G-250 como reagente de coloração e para estabelecimento da curva padrão uma solução padronizada de albumina de soro bovino (BSA) na concentração de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Foram utilizados 10 μL dos extratos proteicos, adicionado de água deionizada e o reagente de coloração, compondo volume final de 1 mL.

4.3.2 Eletroforese SDS-PAGE (1D)

Os géis unidimensionais foram construídos para verificação da integridade dos extratos e identificação de peptídeos via espectrometria de massas nos tratamentos hídrico e salino.

Géis SDS-PAGE (12,5% de poliacrilamida) foram submetidos a eletroforese com voltagem constante de 150 V, em um sistema mini gel com 10 cm x 10 cm. Utilizou-se marcador de baixo peso molecular (LMW Calibration, GE Life Sciences) e foram aplicados 15 μg de proteínas totais cloroplastidiais, adicionadas em igual volume de tampão de amostra e aplicadas no gel. Após a eletroforese, os géis foram corados com azul de Coomassie Brilliant, conforme modificação do método de Candiano *et al.* (2004) e posteriormente digitalizados em scanner de transparência ImageScanner III (GE Life Sciences).

4.3.3 Eletroforese Bidimensional (2D-PAGE)

4.3.3.1 Focalização Isoelétrica (IEF) – 1ª Dimensão

Um total de 150 µg de proteínas de cada extrato foi dissolvido em solução Tris-HCl 50 mM (pH 8,8), ureia 7M, tiureia 2M, Triton 0,4% (v/v), CHAPS 2% (m/v), DTT 70 mM, anfolinas 0,8% (v/v) (IPG buffer, pH 3-10 NL; GE Life Sciences) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). Os extratos foram aplicados sob fitas impregnadas com acrilamida desidratada (IPG 11 cm, gradiente de pH 3-10 não linear; GE Life Science). As fitas IPG reidratadas sofreram focalização isoeletrica no (Multiphor II, GE Life Sciences) durante 6 h a 10°C. Durante a focalização isoeletrica utilizou-se as seguintes condições: 150V-2 h, 300V-1h, 500V-1h, 6000V-2 h. Após a focalização isoeletrica, as fitas foram armazenadas a -80°C.

As fitas IPG foram equilibradas em duas soluções redutoras de pontes de dissulfeto. A solução de equilíbrio é composta por Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), ureia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v) (solução estoque). A primeira solução é composta da solução estoque e DTT e a segunda solução é composta da solução estoque, e iodoacetamida 2,5% (m/v) (Görg *et al.*, 1987) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). As fitas IPG foram equilibradas por 15 min em cada solução.

4.3.3.2 Eletroforese 2D-PAGE – 2ª Dimensão

A segunda dimensão da eletroforese foi conduzida em gel vertical de poliacrilamida, no sistema 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 foi realizada a 120 V, 20 mA e 30 W em condições constantes, com duração de 30 min, tempo necessário para que ocorra

a transferência da amostra para o gel. A segunda etapa da corrida ocorreu a 600 V, 50 mA de corrente e 30 W de potência novamente em condições constantes, por aproximadamente 1 h e 30 min.

4.3.3.3 Visualização das Proteínas

Completada a eletroforese bidimensional, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* coloidal G250, conforme modificação do método de Candiano *et al.*, (2004) descrita por Souza (2006). Em seguida foram mergulhados em solução fixadora (etanol 40%, ácido acético 10%) por 30 min sob agitação constante. Após o descarte da solução fixadora, adicionou-se a solução de coloração (corante Coomassie blue PlastGel blue R, GE Life Sciences) 0,02% em metanol, ácido acético e água deionizada na proporção de 3:1:6, respectivamente. Este procedimento foi realizado duas vezes, com duração de 45 min cada um. Após o procedimento de coloração, o gel foi descorado através de quatro lavagens subsequentes em solução descorante (etanol 20%, ácido acético 5%) de 15 min, 45 min e duas vezes de 2 h. Após as lavagens os géis foram armazenados em solução de preservação (ácido acético 5%).

4.3.3.4 Obtenção e Análise das Imagens

As imagens dos géis 2D do subproteoma de cloroplastos de pinhão-mansão foram digitalizadas no ImageScanner III (GE Life Sciences) com uso do programa LabScan 6.0 (GE Life Sciences). Foram utilizados os seguintes parâmetros: modo de transparência, resolução de 300 dpi e filtro vermelho, ideal para coloração de géis com Coomassie blue.

As imagens obtidas foram analisadas com o auxílio do software Image Master 2D Platinum v7.05 (GE Life Sciences) o qual fornece informações dos *spots* como sua localização no gel, o ponto isoelétrico (pI), a massa molecular (MW) e porcentagem (%) de volume, além de informar as comparações e inferências estatísticas, como a razão da % de volume (Ratio), referente a razão entre dois *spots* correspondentes em um match, e o valor da ANOVA. Desta forma foram considerados *spots* com Ratio $\geq 1,5$ e ANOVA $\leq 0,05$, promovendo confiabilidade estatística aos dados.

4.3.3.5 Tripsinização e Sequenciamento de Peptídeos

Os *spots* selecionados foram excisados manualmente dos géis e estocados a -20 °C em água deionizada. Em seguida, foi realizada a descoloração e remoção de SDS dos *spots* por incubação em solução com 50% de metanol e 2,5% de ácido acético por 3 h a temperatura ambiente seguindo de desidratação com solução de acetonitrila (100%). Em seguida as proteínas foram reduzidas com solução de DTT (Ditiotreitol) a 10 mM por 30 min, depois alquiladas em solução de IAA a 50 mM, também por 30 min. Posteriormente, o *spot* foi lavado com bicarbonato de amônio a 100 mM e novamente desidratado com acetonitrila (100%) por três vezes. Finalizadas estas etapas, foi adicionada a solução contendo tripsina na concentração de 20 ng. μL^{-1} e incubado a 37 °C em banho seco, por 16 h, garantindo a máxima tripsinização da proteína. Ao *spot* foi adicionada a solução de extração [5% de ácido trifluoroacético (TFA) em solução com 50% de acetonitrila] e incubada por 40 min em banho de gelo. Em seguida, a solução foi retirada e adicionada à solução remanescente de tripsina. Este procedimento foi realizado duas vezes, totalizando duas extrações. Por fim, as

amostras foram totalmente evaporadas, utilizando evaporadores centrífugos tipo Speed-Vac (Eppendorf) e armazenadas a -20 °C até a realização das análises por espectrometria de massas.

4.3.4 Fragmentação (MS) e Sequenciamento das Proteínas

Os peptídeos obtidos a partir dos fragmentos do 1D e spots 2D selecionados foram analisados via espectrometria de massas para identificação presumível em analisador AutoFlex III ToF/ToF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), baseado na ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI/ToF), localizado no CETENE (Centro de Tecnologia de Nordeste). Para tanto, os peptídeos concentrados e secos foram eluídos em Solução de Matriz (1% ácido α -ciano-4-hidrocinâmico). Os espectros MS foram obtidos de acordo com os parâmetros do método reflexivo (RP_Proteomics), excluindo-se da análise íons com m/z menor que 700 Da. Os espectros obtidos foram analisados no programa Flex Analysis (BRUKER).

4.3.5 Identificação das Proteínas

Os espectros de massa dos peptídeos foram submetidos à identificação presumível pelo programa *online* MASCOT (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html), utilizando como parâmetros: a base de dados SWISSPROT (<http://www.uniprot.org/>); organismo Viridiplantae; como modificações pós-traducionais a oxidação da metionina e a

carboximetilação. A partir da identificação foi realizado alinhamento de sequências aminoacídicas através do programa BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra o banco de dados de proteínas UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>), sendo considerado significativo alinhamento com *e value* < 0,05 e Max ident = 100%.

5. Resultados

5.1 Análises Fisiológicas (Experimento em Condições de Salinidade)

5.1.1 Clorofila *a*, Clorofila *b*, Clorofila Total e Carotenoides

O teor de clorofila *a*, *b* e total não diferiram estatisticamente ($P < 0,05$) nas folhas de pinhão-mansão após 2 e 72 h de exposição ao estresse por 200 mM de NaCl (Figuras 4A, 4B e 4C, respectivamente). Os teores de carotenoides apresentaram uma queda significativa ($P < 0,05$) com relação ao controle, para 2 h de exposição ao estresse salino e não diferiu após 72 h (Figura 4D).

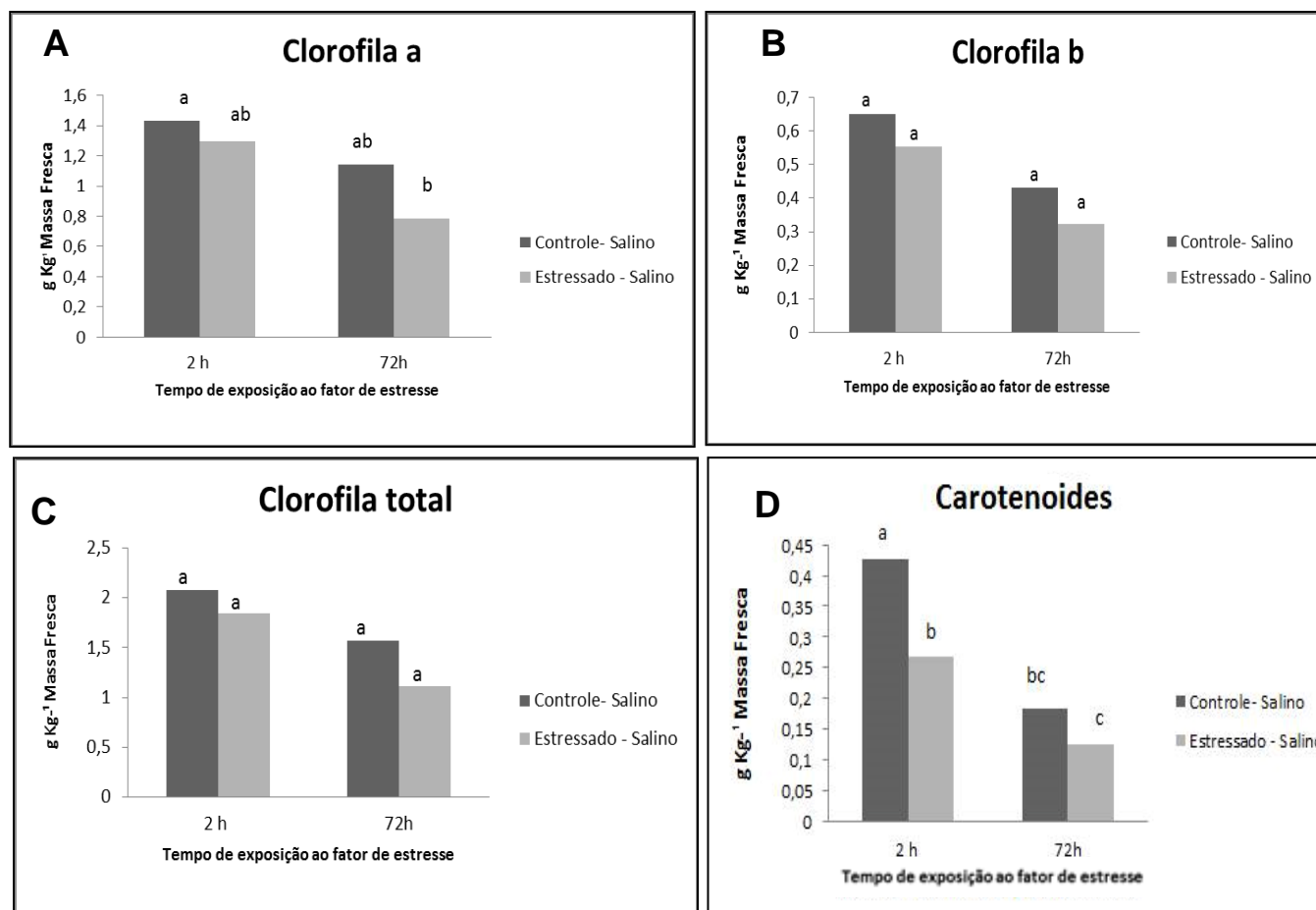


Figura 4. Valores médios de percentuais de: A) Clorofila *a*. B) Clorofila *b*. C) Clorofila total. D) Carotenoides em pinhão-mansão, sob estresse salino, cultivadas em areia lavada em casa de vegetação, após 2 e 72 h de exposição ao estresse com 200 mM de NaCl, tendo como parâmetro o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras comuns nas duas condições não diferem entre si, estatisticamente.

5.1.2 Relações Hídricas e Trocas Gasosas

Após 2 e 72 h de exposição ao estresse por NaCl (200 mM), as plantas analisadas apresentaram aumentos significativos no percentual de vazamento de eletrólitos (danos na membrana) em relação ao tratamento controle (Figura 5A). Depois das 2 h de exposição ao NaCl as plantas de pinhão-mansinho apresentaram um aumento significativo de 42% e após 72 h um aumento de 52,6%, em relação aos respectivos controles no vazamento de eletrólitos.

Para a variável teor relativo de água (TRA), não foram verificadas diferenças significativas nas plantas de pinhão-mansinho expostas ao estresse salino por 2 e 72 h (200 mM de NaCl). O teor relativo de água apresentou uma tendência geral de redução com o nível crescente de sal após 2 h de exposição ao estresse salino, quando comparado ao controle (Figura 5B).

Foi verificada redução significativa ($P \leq 0,05$) no potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}) após 2 h de estresse salino, em relação ao seu controle, cujos valores médios oscilaram de -1,38 MPa (controle) a -2,38 MPa (estresse mais severo), conforme verificado na Figura 5C. Não foram observadas diferenças significativas no Ψ_{wf} , no tratamento estressado após 72 h de exposição ao NaCl, em relação ao controle.

Para a transpiração foliar (E), houve reduções de 82% e 85%, respectivamente, após 2 e 72 h de exposição à salinidade, respectivamente (Figura 5D).

As plantas sob estresse salino apresentaram reduções significativas na fotossíntese (A) após 2 e 72 h de exposição ao estresse salino (Figura 5E).

A condutância estomática (gs) decresceu com o aumento da salinidade. Após 2 h de exposição ao sal, foi verificada redução significativa (94%) na condutância estomática com relação ao tratamento controle, e, continuou reduzindo drasticamente após 72 h (97%), apresentando o maior percentual de redução em relação ao controle (Figura 5F).

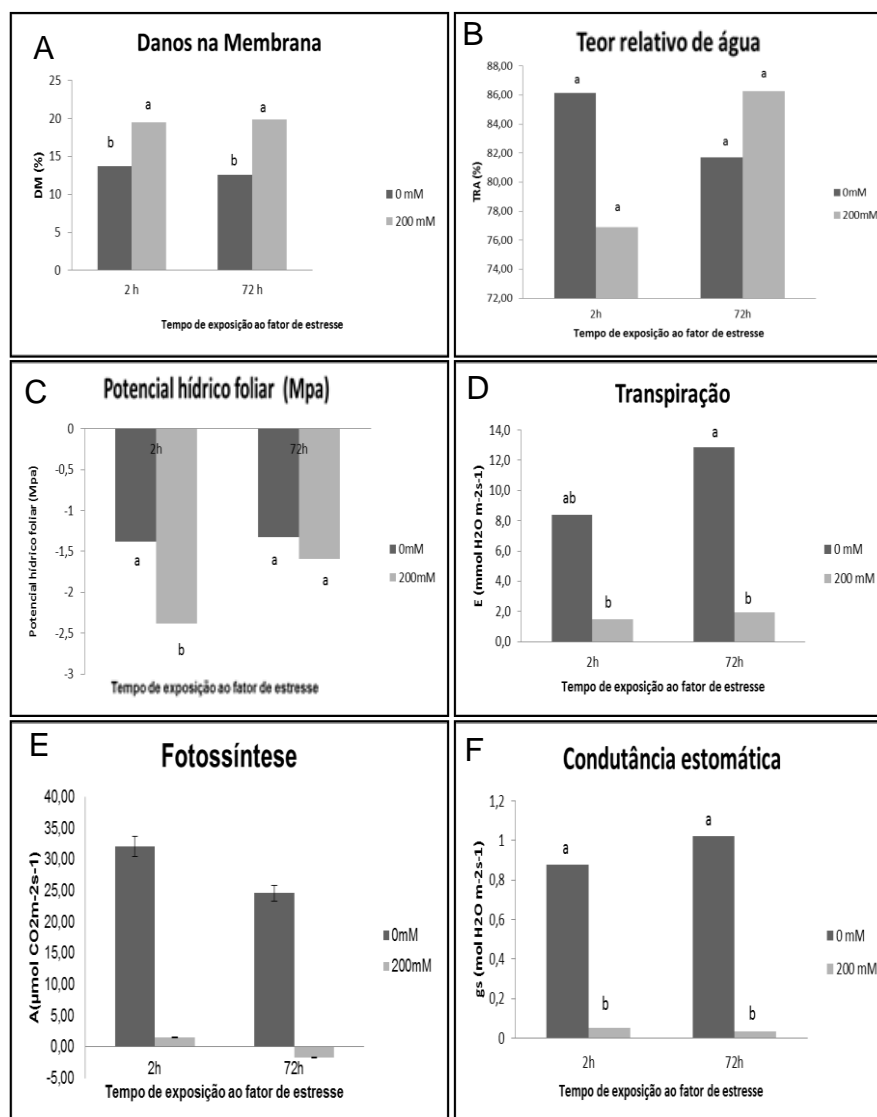


Figura 5. Valores médios de dados fisiológicos de pinhão-mansô sob condições de salinidade: A) Danos na membrana celular. B) Teor relativo de água. C) Potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}). D) Transpiração foliar (E). E) Fotossíntese líquida (A). F) Condutância estomática (gs) em pinhão-mansô sob estresse salino, cultivadas em areia lavada em casa de vegetação, após 2 e 72 h de

exposição ao estresse com 200 mM de NaCl, tendo como parâmetro o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras comuns nas duas condições não diferem entre si, estatisticamente.

5.2 Análises Fisiológicas (Experimento em Condições de Déficit Hídrico)

5.2.1 Trocas Gasosas [Fotossíntese (A), Transpiração (E) e Condutância Estomática (gs)]

As variáveis das trocas gasosas (A, E e gs) foram utilizadas para marcar o momento da coleta das folhas de pinhão-mansão em condições de déficit hídrico, que seria quando os estômatos apresentassem fechados. O resultado pode ser observado na Figura 6, onde os valores de fotossíntese (Figura 6A), transpiração (Figura 6B) e condutância estomática (Figura 6C) encontraram-se com valor próximos de zero (após o quinto dia sem rega), indicando o possível fechamento estomático por suspensão da rega diária e apresentando grande diferença significativa em relação ao tratamento controle nesse mesmo dia de avaliação.

Para a variável transpiração, no momento da coleta, foi observada uma redução significativa em relação às plantas do tratamento controle, porém as plantas ainda estavam transpirando no momento da coleta, no quinto dia.

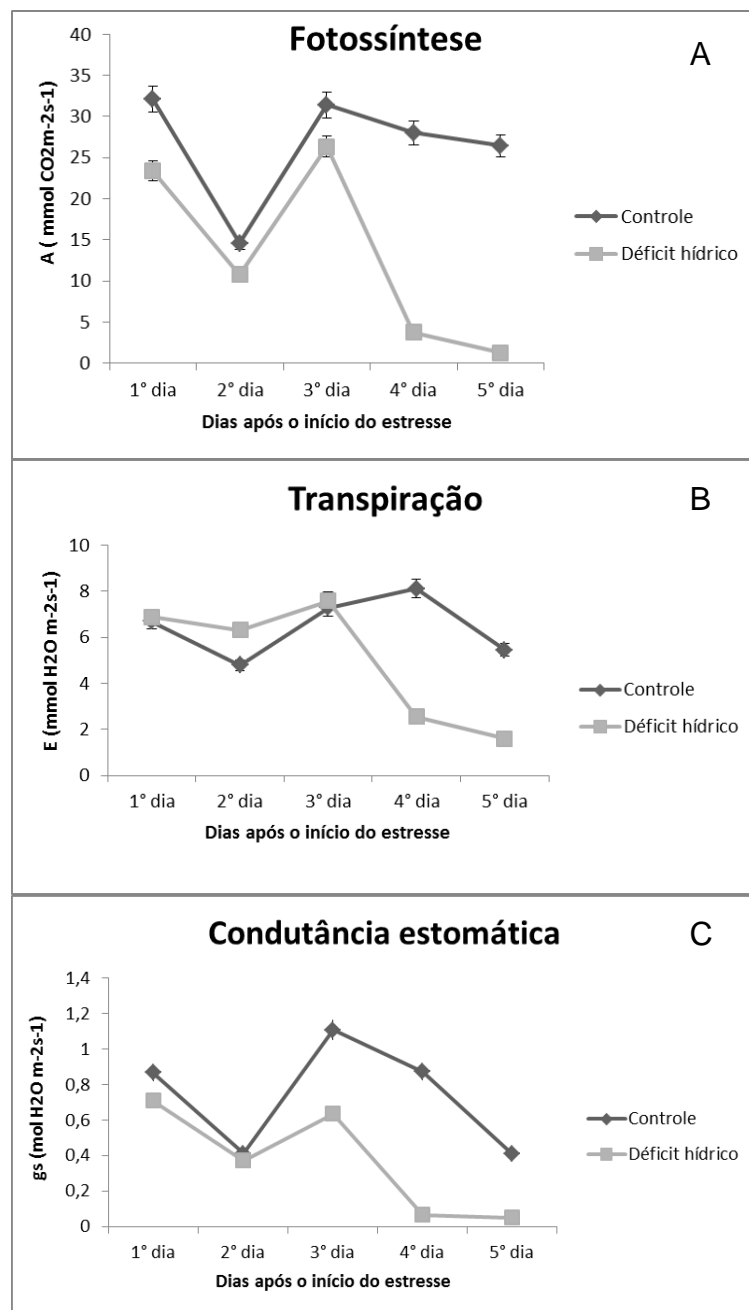


Figura 6. Valores médios de dados fisiológicos de pinhão-mansó em condições de déficit hídrico: A) Fotossíntese líquida (A). B) Transpiração foliar. C) Condutância estomática (g_s) em pinhão-mansó, cultivados em casa de vegetação do 1º ao 5º dia de estresse hídrico.

5.2.2 Relações Hídricas [Potencial Hídrico Foliar (Ψ_{wf}) e Teor Relativo de Água (TRA)]

No momento da coleta (após o 5º dia de estresse), as plantas que deixaram de receber a rega diária apresentaram reduções significativas no potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}) (-1,3 MPa) em comparação as plantas controle (-2,3 MPa) como pode ser visto na Figura 7A.

Para o TRA não foram verificadas diferenças estatísticas (Figura 7B).

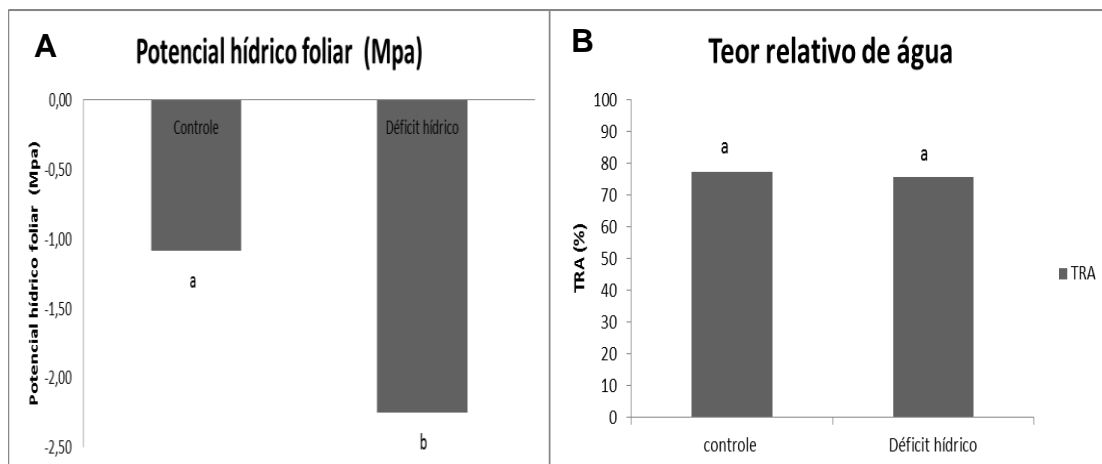


Figura 7. Valores médios dos dados fisiológicos de pinhão-mansó sob condições de déficit hídrico:

A) Potencial hídrico foliar (Ψ_{wf}). B) Teor relativo de água (TRA) em plantas de pinhão-mansó cultivados em casa de vegetação após o 5º dia em condições de déficit hídrico, tendo como parâmetro o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras comuns nas duas condições não diferem entre si, estatisticamente.

5.2.3 Clorofila *a*, Clorofila *b*, Clorofila Total e Carotenoides

Sob condições de déficit hídrico, as plantas de pinhão-mansó não apresentaram diferenças estatísticas para os teores de clorofila *a*, *b*, total e carotenoides (Figura 8A, 8B, 8C e 8D), respectivamente.

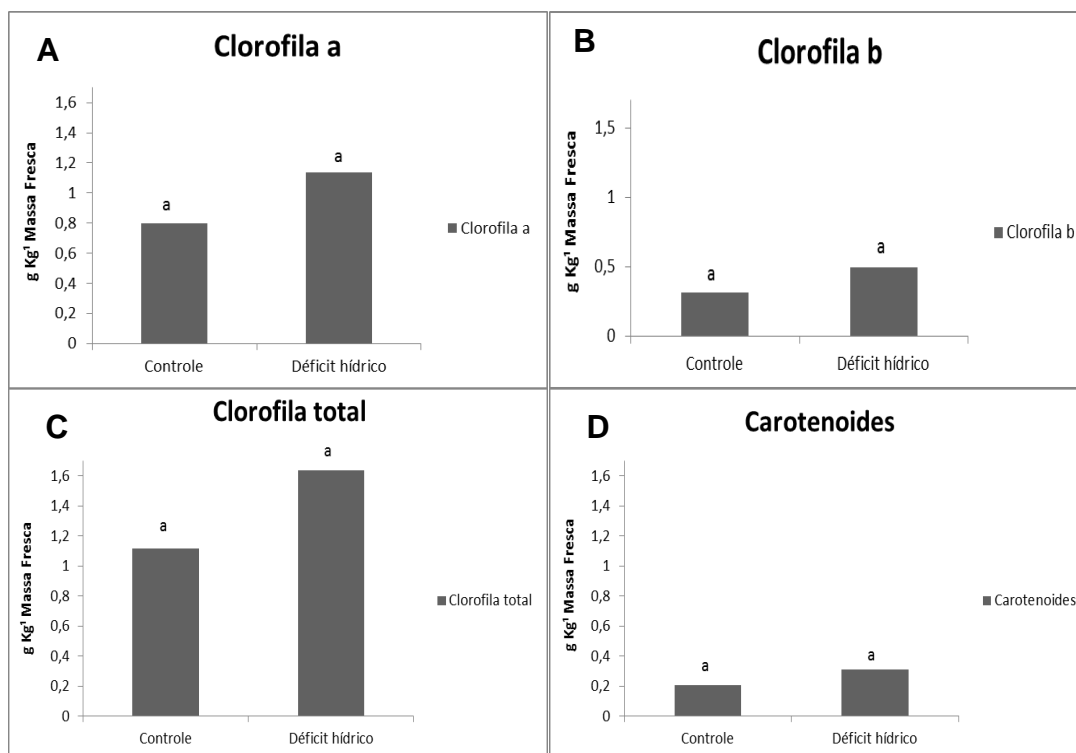


Figura 8. Valores médios dos teores de: A) Clorofila *a*. B) Clorofila *b*. C) Clorofila total e D) Carotenoides em plantas de pinhão-mansó cultivados em casa de vegetação após o 5º dia em condições de déficit hídrico, tendo como parâmetro o teste de Tukey a 5% de probabilidade, letras comuns nas duas condições não diferem entre si, estatisticamente.

5.3 Análise Proteômica

5.3.1 Testes de Protocolos para Purificação de Cloroplasto e Extração de Proteínas de Cloroplastos

Foram realizados vários testes para purificação adequada de cloroplastos de pinhão-mansão, entretanto o mais apropriado foi o protocolo 6, desenvolvido neste trabalho. A utilização do pistilo/cadinho e do liquidificador para macerar e triturar as folhas, mostrou-se mais eficiente para a purificação de cloroplasto de pinhão, em detrimento da maceração em nitrogênio líquido lisa os cloroplastos, ou mesmo a maceração apenas no cadinho com a solução.

A filtração e as sucessivas centrifugações servem para diminuir a quantidade de material vegetal que não são de interesse. As etapas do gradiente de sacarose servem para separar as mitocôndrias e os núcleos, dos cloroplastos, conforme Figura 9.

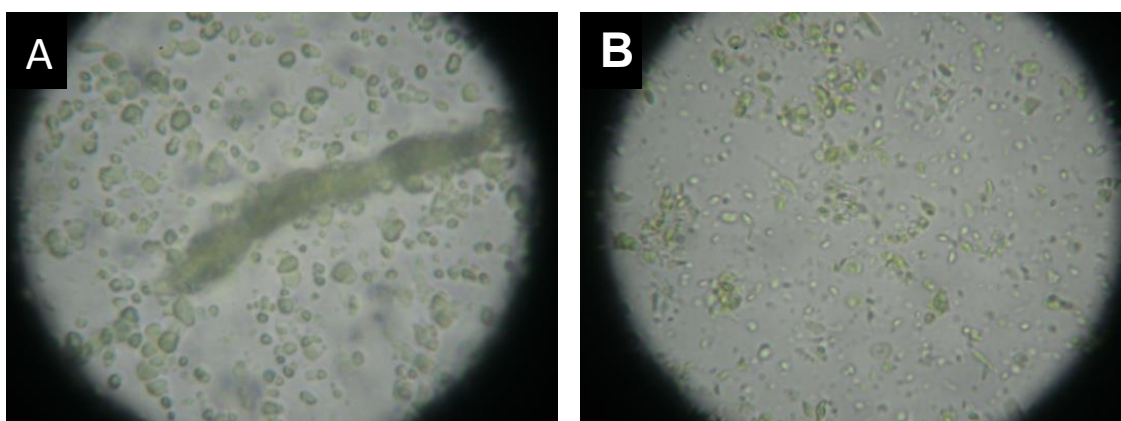


Figura 9. Imagens das amostras ricas em cloroplastos, visualizadas no microscópio. A) Após a segunda centrifugação, ainda com fragmentos celulares. B) Após a etapa do gradiente de sacarose.

5.3.2 Análise do Gel SDS-PAGE

Os valores médios da concentração de proteínas de cloroplasto sob estresse salino, com três réplicas biológicas variaram de 0,64 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 1,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A qualidade desses peptídeos foram visualizadas em gel SDS-PAGE, Figuras 10 e 11.

Fragmentos dos géis foram selecionados, excisados, analisados através da espectrometria de massa e identificados, presumidamente, para análise qualitativa das proteínas nos tratamentos salino (Figura 10) e hídrico (Figura 11).

As sequências de aminoácidos, após serem comparadas com o banco de dados de proteínas do Uniprot, foram identificadas e distribuídas em categorias de acordo com o seu processo biológico ou função (Figura 12 e 13), tais como: fotossíntese, proteínas de transporte, resposta de defesa, metabolismo de carboidratos, biossíntese de ácido graxos, metabolismo de actina, processamento de RNA e tradução.

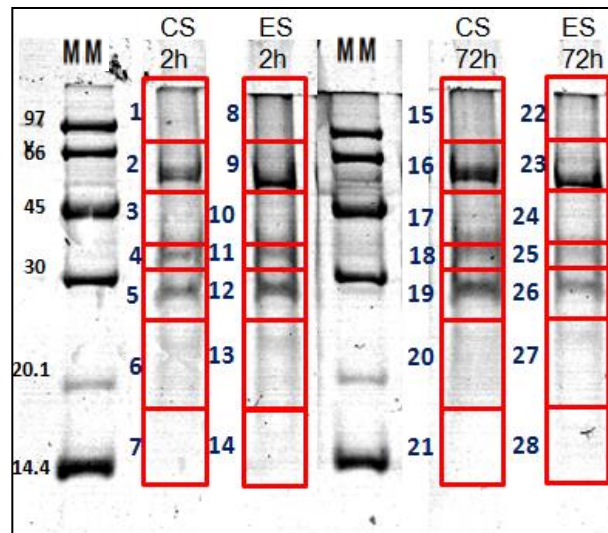


Figura 10. Localização dos fragmentos excisados do gel SDS-PAGE (1D) de cloroplastos de pinhão-mansó submetidos a 2 e 72 h de estresse salino para análise no espectrômetro de massas (MM: Marcador Molecular; CS: Controle Salino; EH: Estresse Salino; 1-29: Numeração dos fragmentos do gel).

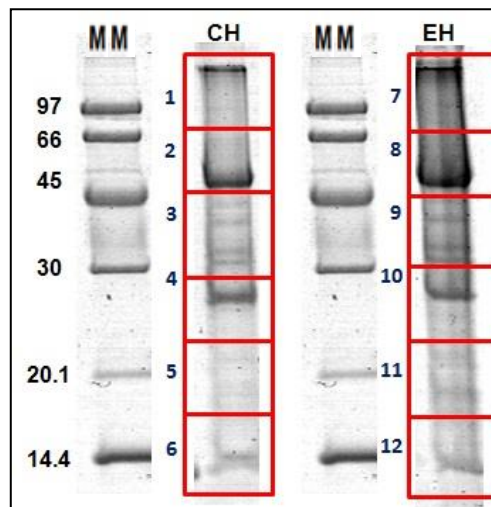


Figura 11. Localização dos fragmentos excisados do gel SDS-PAGE (1D) de cloroplastos de pinhão-mansó submetido a estresse hídrico para análise no espectrômetro de massas (MM : Marcador Molecular; CH: Controle Hídrico; EH: Estresse Hídrico; 1-12: Numeração dos fragmentos do gel).

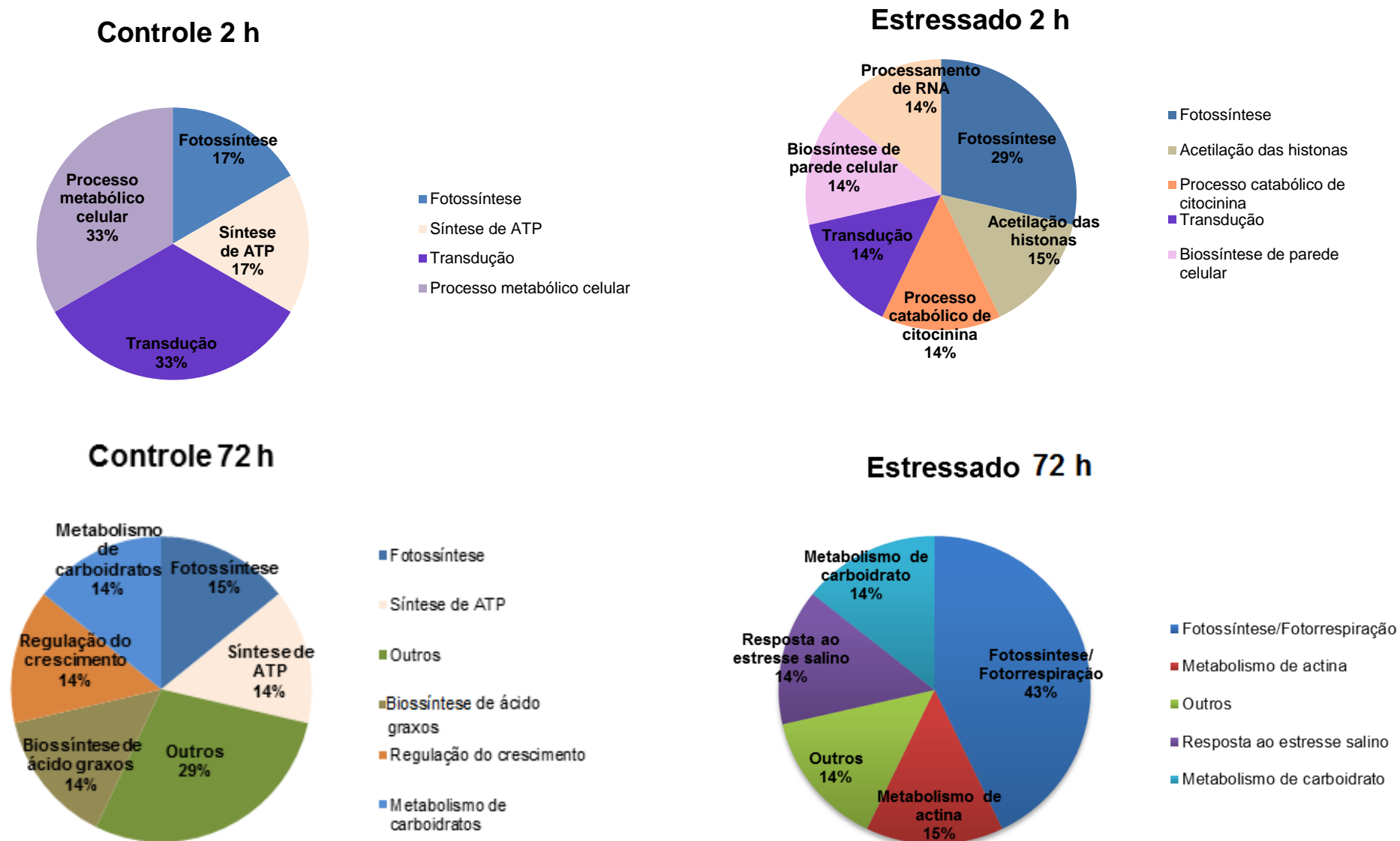


Figura 12. Anotação ontológica dos peptídeos identificados em plantas de pinhão-mansinho submetidas a estresse salino nos períodos de 2 e 72 h utilizando a ferramenta Gene Ontology (GO) da base de dados UNIPROT.

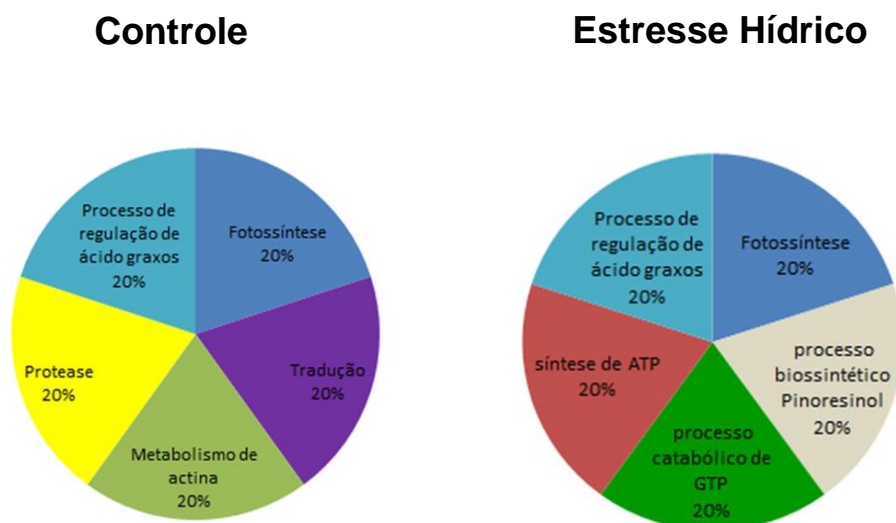


Figura 13. Anotação ontológicas dos peptídeos identificados em plantas de pinhão-mansão submetidas a estresse hídrico utilizando a ferramenta Gene Ontology da base de dados UNIPROT.

5.3.3 Análise do Gel 2D

Os géis 2D, do déficit hídrico, foram feitos em três réplicas biológicas de cada condição (controle x estressado), entretanto, utilizou-se uma cópia da réplica para realizar a análise, como pode ser observado na Figura 12. Desta forma, apesar dos *spots* selecionados terem um Ratio $\geq 1,5$ e ANOVA $\leq 0,05$.

Uma visão global da análise das imagens feitas no programa ImageMaster pode ser visualizada na Figura 14.

Foram visualizados no total, 53 *spots* no gel controle e 86 no gel referente ao estresse hídrico e, destes, 16 e 39 exclusivos de cada um dos tratamentos, respectivamente. Os *spots* foram distribuídos por ponto isoelétrico (pI) de 3 a 10 e massa molecular entre 14,4 e 97 kDa, mas apresentaram maior concentração no intervalo de pI entre 5 e 8, e massa molecular (MM) entre 30 e 66 kDa.

Nas séries de comparações onde o parâmetro condição de déficit hídrico, verificou-se expressão diferencial dos *spots* no tratamento aplicado. Na análise qualitativa dos géis 2D, foram verificados 38 *spots* comuns aos dois tratamentos e 14 DEPs (peptídeos diferencialmente expressos). Foram selecionados um total de 14 *spots* com a razão de variação da porcentagem de volume $\geq 1,5$ e ANOVA $\leq 0,05$. Dentre esses, apenas, os DEPs quatro eram *spots* comuns (*spots* 9, 22, 33, 21), cinco estavam presentes apenas nos géis referentes a estresse hídrico (44, 46, 51, 54, 56) e cinco nos géis controle (85, 86, 87 e 89). Na Figura 15, pode ser observada a distribuição dos peptídeos diferencialmente expressos em pinhão-mansão na condição de déficit hídrico de acordo com sua anotação no Gene Ontology (GO).

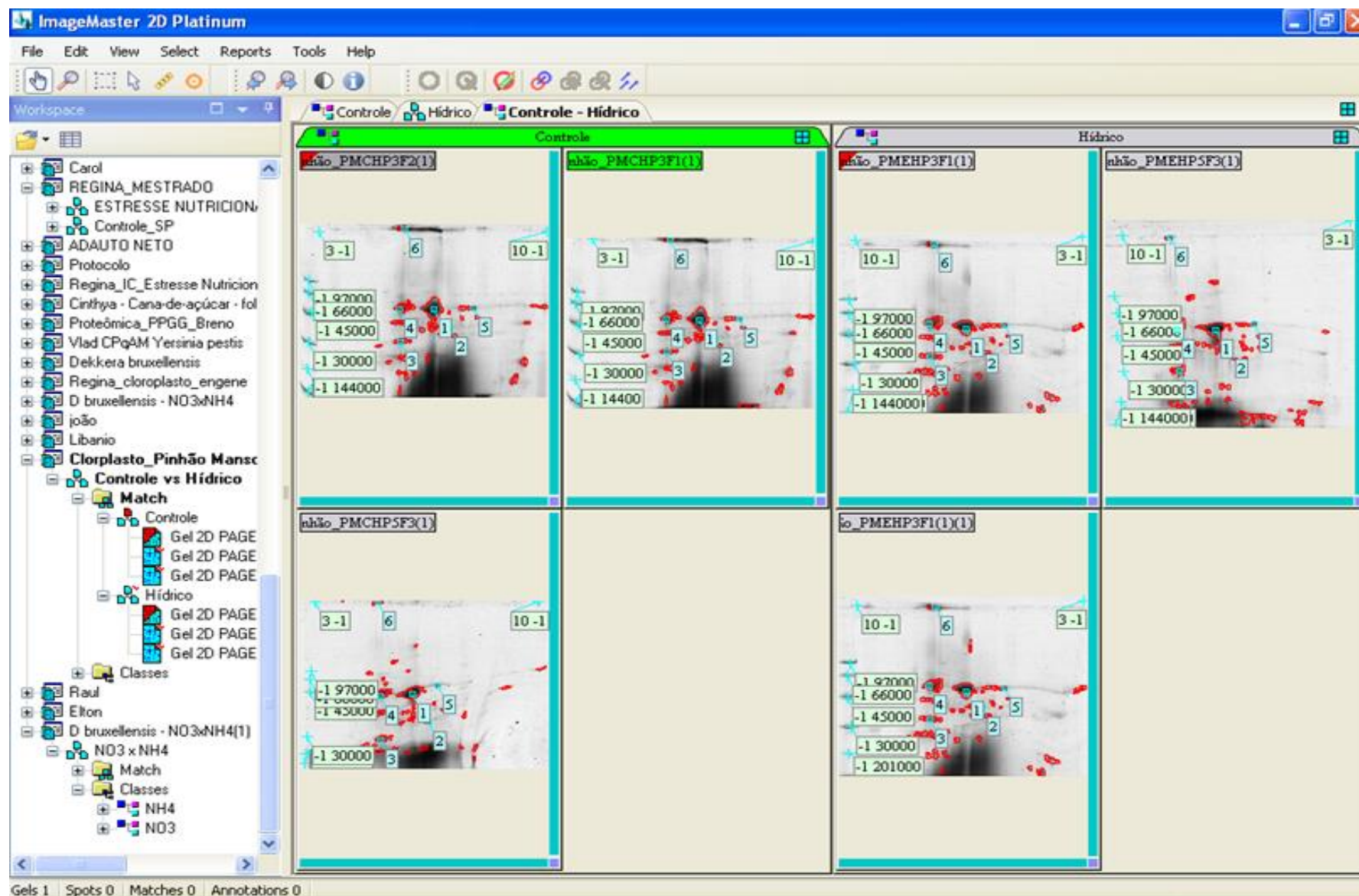


Figura 14. Análise comparativa entre os géis de amostras cloroplastidiais de pinhão-manso sob estresse hídrico, cultivadas em casa de vegetação.

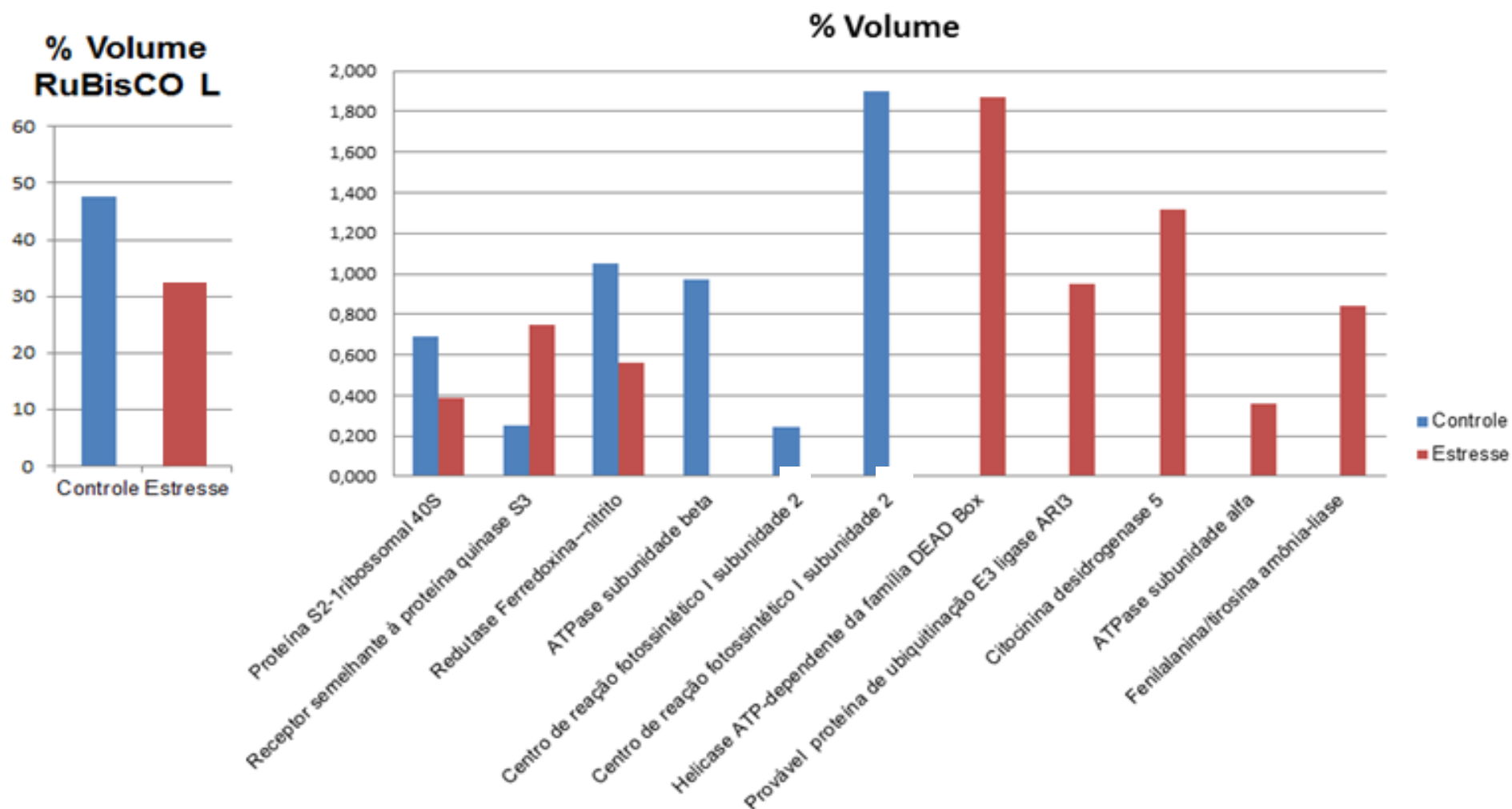


Figura 15. Distribuição dos peptídeos diferencialmente expressos em pinhão-mansão na condição de déficit hídrico de acordo com sua anotação no GO (Gene Ontology).

5.3.4 Anotação Presumível dos Peptídeos em Condições de Déficit Hídrico e Salinidade

Foram enviados para sequenciamento via espectrometria de massas um total de 40 fragmentos do gel 1 D (déficit hídrico e salino) e 14 *spots* do gel 2D (déficit hídrico). Dentre esses foi sequenciado com êxito um total de 37 peptídeos expressos oriundos do gel 1 D (Tabelas 1, 2 e 3) e 12 peptídeos do Gel 2D (estresse hídrico, nas Tabelas 4, 5 e 6).

Os arquivos gerados da espectrometria foram submetidos à identificação presumível pelo programa *online* MASCOT, utilizando o banco de dados SWISSPROT, que gera o provável peptídeo, massa, pI e a sequência aminoacídica. A partir da identificação foi realizado alinhamento de sequências aminoacídicas através do programa BLASTp no banco de dados de plantas para identificação das categorias de acordo com o seu processo biológico ou função molecular e localização celular, através de sua anotação no GO, nas respectivas Tabelas. Para confirmar que estas sequências também estavam expressas em euforbiáceas, realizou-se a anotação no Genbank.

Faz-se necessário ressaltar que os fragmentos 1, 3, 7 e 15 (Tabelas 3, 1, 3 e 2 respectivamente), não foram identificados no procedimento de espectrometria de massas.

Tabela 1. Anotação presumível dos peptídeos detectados em secções de SDS-PAGE (1D) de amostras submetidas ou não à condição de estresse por salinidade, após 2 h do início do estresse, contra bancos de dados de proteínas de espécies vegetais (M: Mascot; U: Uniprot; G: NCBI; ns: sem similaridade significativa).

Fragmento do Gel	Peptídeo	Acesso		Anotação presumível	Score	Id%	e-value	Espécie ortóloga	Localização Subcelular
Controle 2 h									
1	RGGLDFTKDDENVNSQPFMRW	RBL_WATAN	M	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	61	31	0,03	<i>Oryza sativa</i>	Cloroplasto
		Q4VSE7	U	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	168	100	3,0x10 ⁻¹⁶	<i>Asplenium dimorphum</i>	
		AFD04556.1	G	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	53	100	3,0x10 ⁻¹²	<i>Jatropha capensis</i>	
2	RGMKVIDTGAPLSVPVGGATLGRI	ATPB_PHA AO	M	ATP sintase subunidade beta	77	36	0,00071	<i>Phalaenopsis aphrodite</i>	Cloroplasto
		H6THA3	U	ATP sintase subunidade beta	171	100	1,0x10 ⁻¹⁵	<i>Hydrocharis morsus-rana</i>	
		BAF40469.1	G	ATP sintase subunidade beta	49	96	2,0x10 ⁻¹⁰	<i>Jatropha integerrima</i>	
3	Não identificado								
4	KVLCTWSRYGTPNTHQVLTLETGKR	FB305_ARATH	M	Proteína F-box At1g53360	41	28	2.6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Citoplasma/Membrana Plasmática
		Q3ECR3	U	Proteína F-box At1g53360	203	100	4,0x10 ⁻²⁰	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
		Ns	G						
5	KIYVIGGCEDKIQVEVYDPKS	FBK34_ARATH	M	Proteína F-box/kelch-repeat At2g22050	46	28	0.84	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cloroplasto
		Q1PF20	U	Proteína F-box/kelch-repeat At2g22050	162	100	2,0x10 ⁻¹⁴	<i>Arabidopsis thaliana</i>	

		XP_002532272.1	G	Proteína AFR/F-box	-	43	0,007	<i>Ricinus communis</i>	
		P2C54_ARATH	M	Fosfatase 2C 54	44	29	1,4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
6	KIENNGDVGTSEGTSLVLDALMAEVAIKDKD	Q9T010	U	Fosfatase 2C 54	227	100	2,0x10 ⁻²³	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Citoplasma/Membrana plasmática
		Ns	G						
		REHYA_ORYSI	M	1-Cys Peroxirredoxina A	45	38	0,98	<i>Oryza sativa</i>	
7	KQLNMVDPDEKDSNGGHLPSRA	P0C5C9	U	1-Cys Peroxirredoxina A	165	100	7,0x10 ⁻¹⁵	<i>Oryza sativa</i>	Núcleo
		XP_002519297.1	G	Peroxiredoxin, putative	34	71	4,0x 10 ⁻⁷	<i>Ricinus communis</i>	
Estresse salino 2 h									
		RBL_MOLVE	M	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	66	22	0,0086	<i>Mollugo verticillata</i>	
8	RGGLDFTKDDENVNSQPFMRW	Q4VSE7	U	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	168	100	3,0x10 ⁻¹⁶	<i>Asplenium dimorphum</i>	Cloroplasto
		ADD48073.1	G	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	84	100	9,0x10 ⁻¹⁹	<i>Jatropha podagrica</i>	
		RBL_MANZA	M	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	60	23	0,037	<i>Manilkara zapota</i>	
9	RGGLDFTKDDENVNSQPFMRW	Q4VSE7	U	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	168	100	3,0x10 ⁻¹⁶	<i>Asplenium dimorphum</i>	Cloroplasto
		AFD04556.1	G	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	84	100	9,0x10 ⁻¹⁹	<i>Jatropha podagrica</i>	
		ELP3_ORYSJ	M	Elongator complex protein 3	53	26	0,16	<i>Oryza sativa</i>	
10	RKPAPGRGGVLPAGLSEEEARV	Q7X7L3	U	Elongator complex protein 3	162	100	3,0x10 ⁻¹⁴	<i>Oryza sativa</i>	Núcleo
		XP_002511253.1	G	Elongator complex protein 3	32	91	0,008	<i>Ricinus communis</i>	
		CKX5_ARATH	M	Citocinina desidrogenase 5	47	21	0,65	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
11	KQYLPHHATQEEWVAHFGDKW	Q67YU0	U	Citocinina desidrogenase 5	173	100	5,0x10 ⁻¹⁶	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Extracelular

		XP_002510450.1	G	Gulonolactona oxidase	59	76	1,0x10 ⁻¹¹	<i>Ricinus communis</i>	
		RH38_ORYSJ	M	RNA helicase 38 ATP-dependente/DEAD-box	49	19	0,46	<i>Oryza sativa</i>	
12	KMPKITDQVVIGTSGTLMKW	Q10RI7	U	RNA helicase 38 ATP-dependente/DEAD-box	156	100	1,0x10 ⁻¹³	<i>Oryza sativa</i>	Citoplasma/Núcleo/ Membrana plasmática
		XP_002519437.1	G	RNA helicase 38 ATP-dependente/DEAD-box	31	85	0,0016	<i>Ricinus communis</i>	
		GT32_ORYSJ	M	Glucuronosil transferase Os03g0287800	53	18	0,16	<i>Oryza sativa</i>	
13	MGSSTDHGGAGGRGKK	Q10N05	U	Glucuronosil transferase Os03g0287800	111	100	2.0x10 ⁻⁷	<i>Oryza sativa</i>	Golgi/Membrana plasmática
		Ns	G						
		MATK_LUPCO	M	Maturase K	40	14	3,1	<i>Lupinus cosentinii</i>	
14	KYILASKNASLLMNKW	Q5YJV9	U	Maturase K	124	100	3x10 ⁻⁹	<i>Lupinus cosentinii</i>	Cloroplasto
		BAF75603.1	G	maturase K	41	75	9x10 ⁻⁶	<i>Cocconerion minus</i>	

Tabela 2. Anotação presumível dos peptídeos detectados em secções de SDS-PAGE (1D) de amostras submetidas ou não à condição de estresse por salinidade, após 72 h do início do estresse, contra bancos de dados de proteínas de espécies vegetais (M: Mascot; U: Uniprot; G: NCBI; ns: sem similaridade significativa).

Fragmento do Gel	Peptídeo	Acesso	Anotação presumível	Score	Id%	e-value	Espécie ortóloga	Localização Subcelular
Controle 72 h								
15	Não Identificado							
16		RBL_DAPSP	M Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	66	30	0,008	<i>Daphniphyllum sp</i>	
	RGGLDFTKDDENVNSQPFMRW	Q4VSE7	U Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	168	100	3,0x10 ⁻¹⁶	<i>Asplenium dimorphum</i>	Cloroplasto
		ADD48073.1	G Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	84	100	9,0x10 ⁻¹⁹	<i>Jatropha podagrica</i>	
		ATPA_NYMAL	M ATP-sintase subunidade α	54	29	0,13	<i>Daphniphyllum sp.</i>	
	RSVYEPLQTGLIAIDSMPIGRG	Q8HAW6	U ATPase subunidade α	173	100	3,0x10 ⁻¹⁶	<i>Arabidopsis suecica</i>	Cloroplasto
		YP_002720097.1	G ATPase subunidade α	88	100	3,0x10 ⁻¹⁹	<i>Jatropha curcas</i>	
17	RGHLPDVVFTTLLIGGYCEIRE	PP240_ARATH	M Proteína com repetição de pentatricopeptídeo	49	27	0,39	<i>Arabidopsis thaliana</i>	

		Q9LSK8	U	Proteína com repetição de pentatricopeptídeo At3g18020	169	100	$2,0 \times 10^{-15}$	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cloroplasto/ Mitocôndria
		XP_002512275.1	G	Proteína com repetição de pentatricopeptídeo	141	70	$8,0 \times 10^{-7}$	<i>Ricinus communis</i>	
		BCCP_SOLLC	M	Acetil-CoA carboxilase subunidade carreadora de carboxila/biotina	43	92	1,7	<i>Solanum lycopersicum</i>	
18	KVQEGQPVLVLEAMKMEHVVKA	P05115	U	Acetil-CoA carboxilase subunidade carreadora de carboxila/biotina	167	100	$4,0 \times 10^{-16}$	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cloroplasto
		XP_002524738.1	G	Acetil-CoA carboxilase	97	91	$5,0 \times 10^{-15}$	<i>Ricinus communis</i>	
		C734A_ARATH	M	Citocromo P450 734A1	50	27	0,33	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
19	KHPVGFIPLGLVVRTCIGQNLAILQAKL	O48786	U	Citocromo P450 734A1	208	100	$1,0 \times 10^{-20}$	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Membrana Plasmática
		XP_002524439.1	G	Citocromo P450	92	89	$5,0 \times 10^{-19}$	<i>Ricinus communis</i>	
		ERG12_BRANA	M	Esqualeno monooxigenase 1,1	49	20	0,39	<i>Brassica napus</i>	
20	RQGCFDYLSSGGFRT	O65726	U	Esqualeno monooxigenase 1,1	114	100	$8,0 \times 10^{-8}$	<i>Brassica napus</i>	Membrana Plasmática
		XP_002510043.1	G	Esqualeno monooxigenase	33	75	$1,0 \times 10^{-5}$	<i>Ricinus communis</i>	
		ARAE2_ORYSJ	M	Provável UDP-4-epimerase arabinose 2	48	21	0.61	<i>Oryza sativa</i>	
21	RDNYRVTIVDNLSRG	Q8H0B6	U	Provável UDP-4-epimerase arabinose 2	114	100. 0	$8,0 \times 10^{-8}$	<i>Oryza sativa</i>	Golgi/MP
		XP_002529901.1	G	UDP-glucose 4-epimerase	28.5	93	9×10^{-7}	<i>Ricinus communis</i>	

22	RGGLDFTKDDENVNSQPFMRW	RBL_PEA	M	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	86	26	8.2×10^{-5}	<i>Pisum sativum</i>	
		Q4VSE7	U	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	168	100	3.0×10^{-16}	<i>Asplenium dimorphum</i>	Cloroplasto
		AFD04556.1	G	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	24.3	100	3×10^{-12}	<i>Jatropha capensis</i>	
23	RVTPQPGVPPEEAGAAVAESSTGTWTTV WTDGLTSLDRY	RBL_NASOF	M	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase subunidade maior	102	44	2.1×10^{-6}	<i>Nasturtium officinale</i>	
		D3XPS1	U	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	258	100	2.0×10^{-29}	<i>Salix hastata</i>	Cloroplasto
		AFI19917.1	G	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	58.5	100	2×10^{-23}	<i>Jatropha curcas</i>	
24	RFYIQPLSPTEAAARAKD	PSBQ2_ARATH	M	Proteína 3-2 intensificadora da formação de oxigênio	46	36	0.84	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
		Q41932	U	Proteína 3-2 intensificadora da formação de oxigênio.	134	100.0	1.0×10^{-10}	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cloroplasto
		AAV74404.1	G	Proteína intensificadora da formação de cloroplasto	40	67	2×10^{-5}	<i>Manihot esculenta</i>	
25	RSGSGYNECLSTATSSLKT	SCAR3_ARATH	M	Proteína SCAR3	46	15	0.84	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
		Q9LP46	U	Proteína SCAR3	134	100	2.0×10^{-10}	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Citoplasma/Citoesqueleto
		Ns	G						
26	KVAVTLSGEVLIIVAKVEPYPRV	FK129_ARATH	M	Provável F-box/kelch-Proteína de repetição At4g12820	42	22	2.1		
		Q9SU04	U	Provável F-box/kelch-Proteína de repetição At4g12820	167	100	5.0×10^{-15}	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Núcleo/Citoplasma
		Ns	G						

		ACO1_ARATH	M	Aconitate hidratase 1	44	18	1.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
27	RHGDVVIAAITSCTNTSNPSVMLGAALVAKKA	C3VLR3	U	Aconitase	229	100	1.0×10^{-23}	<i>Glycine max</i>	Citoplasma
		XP_002530635.1	G	Aconitase	53.1	100	2×10^{-14}	<i>Ricinus communis</i>	
		ARAE2_ORYSJ	M	Provável UDP-arabinose 4-epimerase 2	44	15	1.2	<i>Oryza sativa</i>	
28	RDNYRVTIVDNLSRG	Q8H0B6	U	Provável UDP-arabinose 4-epimerase 2	114	100	8.0×10^{-8}	<i>Oryza sativa</i>	Golgi/Membrana Plasmática
		XP_002529901.1	G	UDP-glucose 4-epimerase	83.2	87	0.009	<i>Ricinus communis</i>	

Tabela 3. Anotação presumível dos peptídeos detectados em secções de SDS-PAGE (1D) de amostras submetidas ou não à condição de estresse por déficit hídrico, após 5 dias do início do estresse, contra bancos de dados de proteínas de espécies vegetais (M: Mascot; Uniprot; G: NCBI; ns: sem similaridade significativa).

Fragmento do Gel	Peptídeo	Acesso		Anotação presumível	Score	Id%	e-value	Espécie ortóloga	Localização Subcelular
Controle									
1	Não identificado								
		RBL_ACESA	M	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	117	47	6,8×10 ⁻⁸	Acer saccharum	
2	RVTPQPGVPPEEAGAAVAESSTGTWTTVWTDGLTSLDRY	D3XPS1	U	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	258	100	2,0×10 ⁻²⁹	Salix hastata	Cloroplasto
		AF119919.1	G	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	35	100	2,0×10 ⁻²³	Jatropha curcas	
		DIR5_ARATH	M	Proteína dirigente 5	50	53	0.34		Apoplasto
3	RILGGMGIVILSTSRGIMTDRE	H2BC81	U	Proteína ribossomal 30S	165	100	4,0×10 ⁻¹⁵	Anredera baselloides	Cloroplasto
		YP_002720147.1	G	Proteína ribossomal 30S	74	100	1,0×10 ⁻⁹	Jatropha curcas	
		SR543_ARATH	M	Proteína 3 partícula de reconhecimento de sinal 54 kDa	46	15	0,84	Arabidopsis thaliana	Citoplasma
4	RSGSGYNECLSTATSSLKT	Q9LP46	U	Proteína SCAR3	134	100	2,0×10 ⁻¹⁰	Arabidopsis thaliana	Citoesqueleto
		ns	G						
	RILMELLNQMDGFDQTVNVKVIMATNRA	ATPF_OSTTA	M	ATP sintase subunidade	68	25	0,0055	Ostreococcus Tauri	Cloroplasto

5		O65750	U	Subunidade 6 reguladora da protease 26S	219	100	2,0×10 ⁻²²	<i>Cicer arietinum</i>	Citoplasma.
		EEF38699.1	G	Subunidade 6 reguladora da protease 26S	96,1	100	6,0×10 ⁻²⁴	<i>Ricinus communis</i>	Citoplasma
6	RMAGGLADKLSSAMPIS	GLNB_ORYSJ	M	Proteína P-II reguladora de nitrogênio	58	31	0,059	<i>Oryza sativa</i>	
		Q6AUR2	U	Proteína P-II reguladora de nitrogênio	123	100	4,0×10 ⁻⁹	<i>Oryza sativa</i>	Cloroplasto
		ns	G						
Estresse hídrico									
7	Não Identificado		M						
			U						
			G						
8	RVTPQPGVPPEEAGAAVAESSTGTWTTVWTDGLTSLDRY	RBL_ACESA	M	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	105	47	1,1×10 ⁻⁶	<i>Acer saccharum</i>	
		D3XPS1	U	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	251	100	2,0×10 ⁻²⁹	<i>Salix hastata</i>	Cloroplasto
		AFI19919.1	G	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	29,1	100	2,0×10 ⁻²³	<i>Jatropha curcas</i>	
9	MVGQMKSFLLFVFLVLT KT	RR8_NANDO	M	Proteína 8S ribossomal 30S	58	43	0,061	<i>Nandina domestica</i>	Cloroplasto
		Q9SH66	U	Proteína Dirigente 5	155	100	1,0×10 ⁻¹²	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
		EEF42703.1	G	Proteína hipotética conservada	74	91	7,0×10 ⁻⁴	<i>Ricinus</i>	

									<i>communis</i>
10	KASVVMFVGLQGAGKTTTCTKY	SCAR3_ARATH	M	Proteína SCAR3	46	21	0,86	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
		P49967	U	Partícula 3 de reconhecimento de sinal de proteína de 54 kDa	161	100	$3,0 \times 10^{-14}$	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Citoplasma
		EEF44827.1	G	Partícula 3 de reconhecimento de sinal de proteína de 54 kDa	41,8	91	$5,0 \times 10^{-14}$	<i>Ricinus communis</i>	
11	RFKQAQLELDTAKA	PRS6B_SOLTU	M	Transportador de prótons acoplado a síntese de ATP	48	25	0,55	<i>Solanum tuberosum</i>	Citoplasma
		Q0P3K6	U	ATP sintase subunidade b	168	100	$3,0 \times 10^{-6}$	<i>Ostreococcus tauri</i>	Cloroplasto
		ns	G						
12	RMAGGLADKLSSAMPIS	GLNB_ORYSJ	M	Proteína homóloga P-II regulatória do nitrogênio	56	27	0,094	<i>Oryza sativa</i>	
		Q6AUR2	U	Proteína homóloga P-II regulatória do nitrogênio	123	100	$4,0 \times 10^{-9}$	<i>Oryza sativa</i>	Cloroplasto
		ns	G						

Tabela 4. Anotação presumível dos peptídeos (spots) detectados em 2D-PAGE/MS, selecionados com variação significativa entre amostras submetidas ou não à condição de estresse por déficit hídrico, após 5 dias do início do estresse, contra bancos de dados de proteínas de espécies vegetais (M: Mascot; U: Uniprot; G: NCBI; ns: sem similaridade significativa). (*) Ratio EH/C: razão de variação na %Vol do spot na amostra sob estresse hídrico em relação à amostra controle.

Spots	Ratio EH/C*	ANOVA	Peptídeo	Acesso	Anotação presumível (M/U/G)	Score	Id%	e-value	Espécie ortóloga	Localização Subcelular
9	4,4943	0,00056	RVSLDAEQDTKHLVSQIVGIGKL	LRKS3_ARATH	M	Receptor semelhante à proteína quinase S3	54	28	0,15	<i>Arabidopsis thaliana</i>
				Q9STF0	U	Receptor semelhante a proteína quinase S3	166	100	$7,0 \times 10^{-15}$	<i>Arabidopsis thaliana</i>
				NS	G					
21	0,2329	0,01658	RTGLAATQAVPPVVAEVDAGRLPRV	NIR_BETPN	M	Redutase Ferredoxina--nitrito	55	19	0,11	<i>Betula pendula</i>
				P38500	U	Redutase Ferredoxina--nitrito	185	100	$2,0 \times 10^{-17}$	<i>Betula pendula</i>
				XP_002518763.1	G	Redutase Ferredoxina—nitrito	74	71	$2,0 \times 10^{-4}$	<i>Ricinus communis</i>
22	0,5588	0,00615	KLEQIYLHSLPVKEYQIIDHLVGPTLKD	RS21_ARATH	M	Proteína S2-1ribossomal 40S	40	28	3,5	<i>Arabidopsis thaliana</i>
				Q93VB8	U	Proteína S2-1ribossomal 40S	215	100	$9,0 \times 10^{-22}$	<i>Arabidopsis thaliana</i>
				XP_002513493.1	G	Proteína S2-1ribossomal 40S	74,4	85	$4,0 \times 10^{-17}$	<i>Ricinus communis</i>
33	0,6428	0,00787	RGGLDFTKDDENVNSQPFMRW	RBL_ACESA	M	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	71	27	0,0029	<i>Acer saccharum</i>
				Q4VSE7	U	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	168	100	$3,0 \times 10^{-16}$	<i>Arabidopsis suecica</i>
				ADD48073.1	G	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase subunidade maior	74	100	$9,0 \times 10^{-19}$	<i>Jatropha curcas</i>

Tabela 5. Anotação presumível dos peptídeos (spots) detectados em 2D-PAGE/MS, selecionados como exclusivos de amostras não submetidas à condição de estresse por déficit hídrico (controle), após 5 dias do início do estresse, contra bancos de dados de proteínas de espécies vegetais (M: Mascot; U: Uniprot; G: NCBI; ns: sem similaridade significativa). (*) Ratio EH/C: razão de variação na %Vol do spot na amostra sob estresse hídrico em relação à amostra controle.

Spots	Peptídeo	Acesso		Anotação presumível (M/U/G)	Score	Id%	e-value	Espécie ortóloga	Localização Subcelular
85	KEQIFEMPTGGAAIMRQGPNNLLKF	PSBO_TOBAC	M	Centro de reação fotossintético I subunidade 2	45	30	1	<i>Nicotiana tabacum</i>	Cloroplasto
		D8U3K8	U	Provável proteína não caracterizada	185	100	9,0x10 ⁻¹⁸	<i>Volvox carteri</i>	
		XP_002522386.1	G	Proteína 1 intensificadora da formação de oxigênio	77,8	100	8,0x10 ⁻¹⁸	<i>Ricinus communis</i>	
86	Não identificado		M						
			U						
			G						
87	KFEEKDGIDYAAVTQLPGGERV	PSAD_CHLRE	M	Centro de reação fotossintético I subunidade 2	45	30	1,1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Cloroplasto
		K7NZ33	U	Proteína não caracterizada	170	100	4,0x10 ⁻¹⁶	<i>Abies alba</i>	
		XP_002516772.1	G	Centro de reação fotossintético I subunidade 2	74	100	1,0x10 ⁻¹⁸	<i>Ricinus communis</i>	
89	RDTVGGQINVTCEVQQLGNRRV	ATPB_HYOLA	M	ATPase subunidade beta	53	37	0,16	<i>Hyophorbe lagenicaulis</i>	Cloroplasto
		Q85V53	U	ATPase subunidade beta	174	100	2,0x10 ⁻¹⁶	<i>Ornithogalum kochii</i>	
		YP_002720119.1	G	ATPase subunidade beta	70,6	96	2,0x10 ⁻¹⁸	<i>Jatropha curcas</i>	

Tabela 6. Anotação presumível dos peptídeos (spots) detectados em 2D-PAGE/MS, selecionados como exclusivos de amostras submetidas à condição de estresse por déficit hídrico, após 5 dias do início do estresse, contra bancos de dados de proteínas de espécies vegetais (M: Mascot; U: Uniprot; G: NCBI; ns: sem similaridade significativa). (*) Ratio EH/C: razão de variação na %Vol do spot na amostra sob estresse hídrico em relação à amostra controle.

Spots	Peptídeo	Acesso	Anotação presumível (M/U/G)	Score	Id%	e-value	Espécie ortóloga	Localização Subcelular
44	RSVYEPLQTGLIAIDSMPIGRG	ATPA_AETCO	M- ATPase subunidade alfa	72	31	0,0024	<i>Aethionema cordifolium</i>	Cloroplasto
		Q8HAW6	U- ATPase subunidade alfa	173	100	$3,0 \times 10^{-16}$	<i>Asplenium dimorphum</i>	
		YP_002720097.1	G- ATPase	29,1	10	$3,0 \times 10^{-19}$	<i>Jatropha curcas</i>	
46	KEILVRVMELLSVKE	ARI3_ARATH	M- Provável proteína de ubiquitinação E3 ligase ARI3	46	14	0,86	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Biossíntese
		Q9LVX0	U- Provável proteína de ubiquitinação E3 ligase ARI3	113	100	$1,0 \times 10^{-7}$	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
		XP_002510327.1	G- Proteína ariadne-1	74	80	0,009	<i>Ricinus communis</i>	
51	RGKALHGGNFQGTPIGVSM DN ARL	PALY_MAIZE	M- Fenilalanina/tirosina amônia-liase	37	12	6,6	<i>Zea mays</i>	Citoplasma
		D5M8H8	U- Fenilalanina amônia-liase	176	100	$3,0 \times 10^{-16}$	<i>Urochloa brizantha</i>	
		ABI33979.1	G- Fenilalanina amônia-liase	41,8	96	$2,0 \times 10^{-18}$	<i>Jatropha curcas</i>	
54	KLTPPELLKGLHDEMGSRP SKI	RH38_ORYSJ	M- Helicase ATP-dependente da família DEAD Box	54	23	0,15	<i>Oryza sativa</i>	Citoplasma/Núcleo
		Q10RI7	U- Helicase ATP-dependente da família DEAD Box	165	100	$9,0 \times 10^{-4}$	<i>Oryza sativa</i>	
		XP_002519437.1	G- Helicase ATP-dependente da família DEAD Box	32	71	$1,0 \times 10^{-6}$	<i>Ricinus communis</i>	
56	KNYHDSSEIVDQEVEILMKK	CKX5_ARATH	M- Citocinina desidrogenase 5	46	18	0,96	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Região Extracelular
		Q67YU0	U- Citocinina desidrogenase 5	164	100	$1,0 \times 10^{-14}$	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
		XP_002510450.1	G- Gulonolactona oxidase	75,3	57	0,001	<i>Ricinus communis</i>	

6. Discussão

6.1 Estresse Salino

Os dados fisiológicos corroboram no sentido de integrar dados de que as plantas estavam sob estresse, apesar das clorofilas *a* e *b*, não terem diferido estatisticamente, observamos a diminuição dos carotenoides, pigmentos acessórios na absorção e transferência de energia radiante, e protetores da clorofila no tocante à foto-oxidação. O estresse salino induz a degradação de β -caroteno e a redução na formação de zeaxantina, produzindo diminuição no teor de carotenoides, pigmentos aparentemente envolvidos na proteção contra a foto-inibição (Sharma and Hall, 1991).

Os dados do vazamento de eletrólitos, por sua vez indicam que a concentração de 200 mM de NaCl provocou danos na membrana plasmática e que este se tornou maior com o aumento do tempo de exposição ao estresse, pois o excesso de Na^+ e de Cl^- no protoplasma causam toxicidade e ocasionam distúrbios em relação ao balanço iônico, provocando alterações na estrutura das membranas (Shabala *et al.*, 2012).

A redução na fotossíntese pelo aumento da salinidade pode ser devido a uma menor condutância estomática, depressão de processos metabólicos específicos na absorção de carbono, a inibição da capacidade fotoquímica, ou uma combinação destes (Seemann and Critchley, 1985; Dubey, 1997). O sal diminui a eficiência da fotossíntese (Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2002), demonstrando que sob estresse severo uma das respostas iniciais das plantas pode ser o fechamento estomático buscando minimizar a perda excessiva de água (Taiz and

Zeiger, 2009). Sob condições de estresse, especialmente o hídrico e salino, o fechamento estomático é visto como uma resposta positiva da planta para atenuar a perda de água, desde que o aparelho fotossintético seja ajustado a estas condições.

A purificação de cloroplasto e extração de proteínas de cloroplasto em pinhão-mansão pelo método desenvolvido apresentou-se eficiente, pois conseguiu extrair quantidade satisfatória de proteínas em todos os tratamentos analisados. 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).

As 19 proteínas identificadas no tratamento salino foram classificadas em grupos, de acordo com suas funções, que incluíam a síntese de ATP, metabolismo de carbono, ubiquitimação/ proteossomo e resposta ao estresse salino. Os peptídeos anotados estão descritos abaixo, assim como sua correlação com respostas a estresses ambientais.

No experimento salino verificou-se a expressão da subunidade maior da proteína RuBisCO nos fragmentos do gel 1D (salino) após 2 h (Controle: fragmento 1 e estressado: fragmento 8 e 9, Tabela 1) e 72 h (Controle: 16 fragmento e estressado: fragmentos 22 e 23, Tabela 2). De acordo com Eckardt e Pell (1995) os estresses ambientais podem causar inativação reversível ou irreversível na RuBisCO. Quando a inativação é do tipo irreversível a RuBisCO é completamente degradada e substituída por subunidades novamente resintetizadas para restabelecer completamente a função fotossintética. Em análise proteômica de arroz submetido a estresse ao frio, Yang *et al* (2006),

demonstraram que muitas proteínas fotossintéticas foram parcialmente degradadas e, como os componentes fotossintéticos estão funcionalmente ligados, a ocorrência de danos em quaisquer desses componentes podem desencadear uma redução global da atividade fotossintética.

No experimento de estresse salino, verificou-se uma diminuição severa na fotossíntese, indicando possivelmente que, a maior detecção da subunidade grande da RuBisCO na condição de estresse salino pode está associada a degradação da mesma.

A ATPase cloroplastidial é um complexo proteico, localizado dentro das membranas dos tilacóides, que sintetiza o ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (Pi), através do transporte de H^+ , gerado pela oxidação da água no processo fotossintético (Johnson, 2008).

A ATPase está envolvida em vários mecanismos de regulação, modulando sua atividade de acordo com as mudanças ambientais (Konno *et al.*, 2006). A ocorrência da redução drástica da fotossíntese, verificada nesse trabalho, sugere que pode ter tido uma diminuição da síntese de ATP, e consequentemente a redução da atividade da ATPase no cloroplasto, não sendo possível assim, detectá-la nas condições de estresse salino.

No estudo de perfis proteômicos em cloroplastos de folhas de trigo, foi verificada a diminuição na expressão de quatro subunidades da ATP sintase – α , β e γ com o aumento do NaCl, mostrando o impacto negativo do aumento deste sal sobre a maquinaria fotossintética (Kamal *et al.*, 2012). Atualmente, há evidências crescentes de que a ATP sintase também é alvo de um efeito

prejudicial causado pelo estresse salino e molécula singleto de oxigênio (Mahler *et al.*, 2007).

As proteínas F-box organizam-se filogeneticamente em numerosas subfamílias e são caracterizadas pelo seu domínio de interação proteína-proteína no terminal carboxílico, repetições C-terminais (Schumann *et al.*, 2011). As proteínas contendo domínio F-box estão envolvidas na ubiquitinação(UB)/proteossomo. A degradação através do sistema de ubiquitina/proteossoma é um processo em duas etapas. A primeira proteína é marcada pela ligação covalente de ubiquitina e subsequentemente degradada por um complexo de protease multicatalítica, o proteassoma 26S. Este medeia a degradação seletiva de proteínas reguladoras, e é essencial na regulação de processos celulares, incluindo as respostas de defesa e tolerância ao estresse (Lechner *et al.*, 2006; Paquis *et al.*, 2011). Assim, justifica-se a expressão da F-box (ortólogo At4g12820, em *Arabidopsis thaliana*) no tratamento salino, da condição estressada, apesar da expressão da F-Box no tratamento salino, na condição controle (2 h), que podem estar associados às vias de resposta ao hormônio vegetal, auxina, que é responsável pela indução de rápida divisão celular principalmente de folhas jovens e do meristema apical (Lechner *et al.*, 2006).

Para a provável fosfatase 2C, detectada na amostra controle, não é possível afirmar o papel específico na resposta ao estresse. As fosfatases estão envolvidas na regulação de várias vias de sinalização e dividem-se em duas grandes classes: fosfatases M (PPM) e fosfatases P (PPP), estas incluindo as fosfatases do tipo 2C (PP2C). No genoma de *A. thaliana* foram identificadas 112 fosfatases, das quais 76 são do tipo 2C (PP2C), que é a maior família de

proteínas fosfatases nas plantas exibindo alta complexidade, e encontradas como reguladoras de vias de transdução de sinal e também envolvidas no desenvolvimento (Schweighofer *et al.*, 2004).

A proteína Elongator complex protein 3, por sua vez, apresenta atividade de regulação da expressão gênica, na condição de estresse salino (2 h) e sua função apresenta padrões distintos ao descrito na literatura. É considerada uma histona acetiltransferase conservada, que atua como um importante regulador do ciclo celular mitótico para promover a padronização de folhas em *Arabidopsis*. As mutações em genes que codificam subunidades desta proteína resultaram na progressão do ciclo celular aberrante, e a desenvolvimento foliar e a formação de folha alterada (Xu *et al.*, 2012).

Em resposta ao sal, após 2 h da aplicação da solução salina com 200 mM de NaCl, verificou-se a expressão da proteína citocinina desidrogenase. Esta proteína que está envolvida em resposta ao estresse. A citocinina é um hormônio de plantas que regula a divisão celular, o desenvolvimento dos caules, raízes, e folhas. Em plantas como *A. thaliana*, as enzimas envolvidas no metabolismo da citocina são adenosina fosfato-isopentinela transferases e citocininas oxidases/desidrogenases (Hirose *et al.*, 2008; Werner and Schmülling, 2009). A enzima citocinina desidrogenase é responsável pela degradação do hormônio citocinina (Schmülling *et al.*, 2003). Em estudos com a alta expressão dessa enzima em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), sob estresse, notou-se a redução e degradação da citocinina que coincidiu com aumento dos níveis de citocinina desidrogenase o que pode ter contribuído para aumentar a tolerância ao estresse deste genótipo (Macková *et al.*, 2013).

As helicases do tipo DEAD-box estão envolvidas em diferentes mecanismos moleculares de splicing de RNA, tais como, montagem do ribossomo e iniciação da transcrição ou exportação nuclear (Tuteja and Tuteja, 2004). Estudos com arroz (Marcovei *et al.*, 2012; Marcovei and Tuteja, 2012) sugerem que apesar das helicases de RNA estarem associadas com uma gama diversificada de funções celulares, elas estão induzidas na resposta celular ao estresse abiótico, como o salino e a desidratação. Portanto, corroborando a expressão desta proteína no estressado salino (2 h), sugere que essa proteína pode estar associada à tolerância ao estresse salino.

Também observou-se uma provável glucoronosiltransferase encontrada no tratamento de estresse salino 2 h. Esta proteína é responsável pela biogênese da parede celular, que é uma camada extracelular fora da membrana, proporcionando suporte estrutural nas paredes primárias e protegendo a célula contra danos mecânicos, a força osmótica além de determinar a forma da célula (Singh *et al.*, 2009; Atmodjo *et al.*, 2011). A pectina é um polissacarídeo estrutural e funcionalmente o mais complexo das paredes de células de plantas. O estresse salino pode afetar a organização da parede uma vez que ao menos 67 transferases são necessárias para sua síntese (Wang *et al.*, 2007; Mohnen, 2008).

A expressão da proteína maturase K no estressado salino 2 h, está associada ao processamento do RNA no cloroplasto, entretanto, até o momento, não se tem nada descrito na literatura sobre a expressão dessa proteína ligada ao estresse.

A Acetyl-CoA carboxilase é uma enzima reguladora da síntese de ácidos graxos (Keith *et al.*, 1996). Os ácidos graxos são fontes de energia importantes para os tecidos vegetais. Nas células fotossintéticas dos vegetais, a síntese dos ácidos graxos ocorre no estroma dos cloroplastos (Beltrão and Oliveira, 2007). O fato desta proteína ter sido detectada apenas no tratamento controle em folhas de pinhão-manso pode indicar que quando as plantas foram submetidas a 2 e 72 h de estresse salino, houve uma inibição da síntese de ácidos graxos, ao inibirem a enzima Acetyl-CoA carboxylase. O cessamento da biossíntese de ácido graxo pode diminuir o potencial redox de cloroplasto e assim aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Mittler, 2002).

Nas amostras controles 72 h do experimento verificou-se a expressão das proteínas citocromo P450, esqualeno monooxigenase e uma provável proteína UDP-arabinose 4 epimerase, entretanto com valor de *score* menor, mesmo assim são passíveis de discussão, pois de acordo com o alinhamento no Mascot, Uniprot e GenBank (Euphobiaceae), a proteína P450 identificada provavelmente pertence ao grupo das plantas e de acordo com pesquisa contra o banco de dados de euphobiaceae a sequência alinha 87% com a proteína Citocromo P450 em *Ricinus communis*. A função da P450 é realizar a inserção de um átomo de oxigênio em um substrato orgânico enquanto o outro átomo oxigênio é reduzido à água, em uma reação monooxigenase. Estudo com mutantes deficientes na biossíntese de hormônios Brassinoesteroides (BRs), esteroides vegetais que regulam o crescimento e desenvolvimento das plantas, quando ausentes geram lesões nos genes que codificam os citocromos P450, provocando o surgimento de plantas anãs (Ohnishi *et al.*, 2012). Esse fato justifica a presença do citocromo

P450 em amostras controle do tratamento salino (0 mM), em virtude do crescimento e desenvolvimento do pinhão-mansão.

Plantas da espécie Euphorbiaceae produzem látex que contem em grandes quantidade fitoesteróis e triterpenos (Uchida *et al.*, 2007), a proteína esqualeno epoxidase (esqualeno monooxigenase) é uma enzima que catalisa a conversão do esqualeno em 2,3-oxidoesqualeno, um precursor de triterpenoides (Posé *et al.*, 2009), participante do ciclo da biossíntese de esteróis em plantas, agregando mais informação que a expressão dessa proteína no fragmento 20 (Tabela 2) na condição de 0 mM de NaCl, sendo relevante para o processo de síntese de terpenóides na planta estudada.

Nos fragmentos 21 (controle) e 28 (estressado), do gel 1 D (Tabela 2), tratamento salino 72 h, detectou-se uma provável UDP-arabinose 4 epimerase que é uma enzima que catalisa a reação de UDP-L-arabinose e UDP-D-xilose. A xilose e arabinose são os principais componentes da pectina e hemicelulose em todas as plantas, e podem desempenhar importante papel no desenvolvimento da parede celular durante o crescimento (Hayvashi e Maclachlan, 1984). Assim justifica-se a expressão desta proteína tanto na condição controle quanto na estressada, visto que açúcares nucleosídeos são necessários na planta, para que sejam sintetizados os polímeros da parede celular (Geserick *et al.*, 2013).

O fotossistema II (FSII) é um complexo de subunidades de polipeptídeos nas membranas tilacoides, que utiliza-se da energia da luz para catalisar uma série de reações de transferência de elétrons, resultando na separação da água em oxigênio molecular, prótons e elétrons (Hankamer e Barber, 1997).

No estudo direcionado para as proteínas PsbQ e PsbP, utilizando mutantes, verificou-se que PsbQ melhorou a capacidade de retenção dos íons da proteína

PsbP, e que o papel da PsbP é estabilizar PsbP (Kakiuchi *et al.*, 2012). Estes estudos demonstraram que a supressão da PsbP resulta em taxas de crescimento lento e transferência lenta de elétrons para o fotossistema seguinte.

Também verificou-se a expressão da proteína potenciadora do oxigênio (PsbQ), e sua expressão somente foi detectada na amostra estressada 72 h após a aplicação de 200 mM de NaCl, sugerindo que essa proteína possa estar envolvida na estabilidade do fotossistema II, contribuindo assim para a manutenção das proteínas PSbP no processo de oxidação da água, quando a planta está submetida ao estresse salino.

A proteína SCAR 3 em plantas sob estresse salino após 72 h de exposição a 200 mM de NaCl. Segundo a literatura (Uhrig *et al.*, 2007), essa proteína está envolvida na regulação da actina e organização de microtúbulos. O possível motivo da detecção, apenas na condição estressada, sugere que a síntese desta proteína pode ser relacionada ao estresse induzido pela condição de salinidade, salientando ainda mais os aspectos fisiológicos bioquímicos do pinhão-manso como resistente ao estresse salino e hídrico, e que também pode estar associado ao incremento nos danos na membrana celular verificado neste experimento.

Surpreendentemente, observou-se a expressão da proteína aconitase hidratase 1, no tratamento salino, estressado após 72 h de exposição a 200 mM de NaCl proteína essa que envolvida metabolismo energético. Em contraste, estudos com *Arabidopsis* relataram que aconitase é muito sensível ao estresse oxidativo (Navarre *et al.*, 2000).

Com base nos resultados encontrados foi possível traçar modelos esquemáticos da expressão ao estresse salino que resume tudo o que foi discutido anteriormente. (Figura 16).

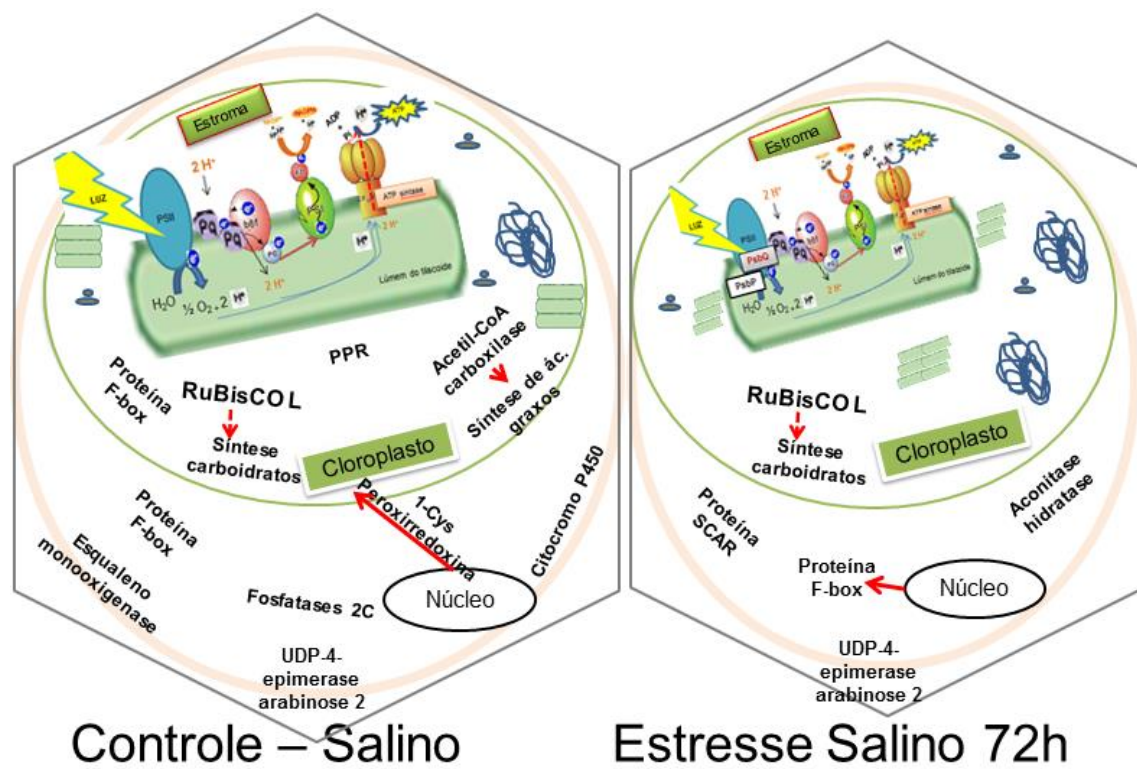
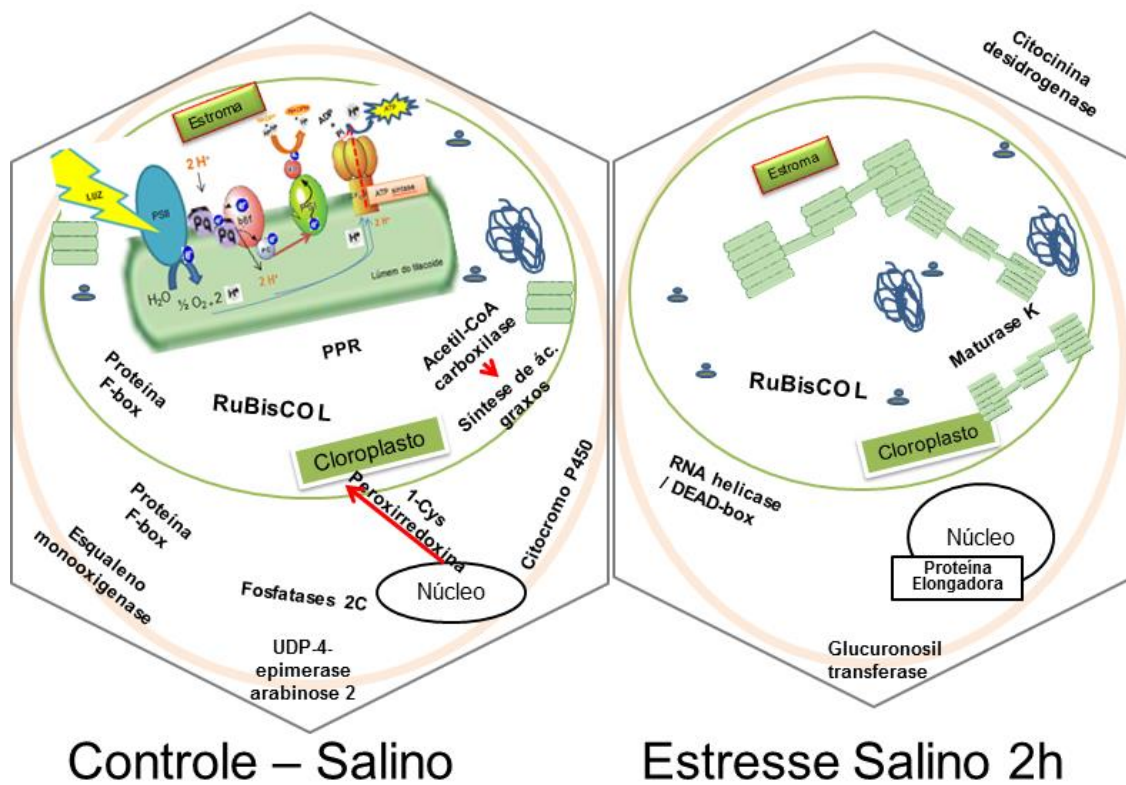


Figura 16. Representação esquemática da expressão de proteínas em pinhão-mansó sob salinidade cultivada em casa de vegetação

6.2. Estresse Hídrico

Em condições hídricas normais as plantas absorvem grande quantidade de água, em contra partida perde-se grande parte do absorvido pela transpiração e qualquer alteração no fluxo de água entre o solo, a planta e a atmosfera prejudicam a produção da cultura. Perante isso, o fechamento estomático é a estratégia mais comumente utilizada pelas plantas para diminuir a taxa de transpiração e manter a turgescência durante as horas mais quentes do dia (Cavalcante, 2001).

As variáveis das trocas gasosas (A , E e g_s) foram utilizadas para marcar o momento da coleta das folhas de pinhão-mansão em condições de déficit hídrico, que seria quando os estômatos apresentassem fechados com valor zero para A e G_s . As plantas com déficit hídrico fecham os estômatos numa tentativa de restringir a perda de água pela transpiração, refletindo de forma negativa sobre a fotossíntese pela diminuição das trocas gasosas (Nogueira *et al.*, 2000).

A limitação estomática à transpiração é uma alternativa para a manutenção do conteúdo hídrico foliar, evitando a dessecação dos tecidos como foi observando nos dados de condutância estomática e transpiração no estresse hídrico.

As 14 proteínas foram classificados em grupos, de acordo com suas funções, que incluíam a síntese de ATP, metabolismo de carbono e enovelamento de proteínas. Os peptídeos anotados estão descritos abaixo, assim como sua correlação com respostas a estresses ambientais.

No experimento de déficit hídrico, verificou-se a expressão da proteína 30 S ribossomal S8 em cloroplasto na condição de estresse hídrico, fragmento 9, Tabela 3. Os ribossomos de plastídios são responsáveis pela síntese de centena

de polipeptídios codificados no DNA plastidial, mas estes incluem algumas das proteínas mais abundantes na biosfera, por exemplo: a subunidade grande da ribulose bifosfato carboxilase / oxigenase (Yamaguchi and Subramanian, 2003). Ribulose bifosfato carboxilase (subunidade grande) também foi expressa nas duas condições do tratamento hídrico.

A protease 26S, encontrada no estresse hídrico, está envolvida na degradação de proteínas ubiquitinizadas. Segundo Lee (2012) a degradação de proteínas desempenha um papel importante em todos os organismos celulares no controle seletivo de proteínas reguladoras e na remoção de proteínas que não são mais necessárias. A capacidade celular para degradar proteínas oxidadas, aumenta a tolerância ao estresse oxidativo (Kureoa *et al.*, 2009).

A proteína homóloga P-II regulatória do nitrogênio foi detectada tanto no controle como no estressado, tratamento hídrico. Essas proteínas são responsáveis pela transdução de sinal, coordenando vários mecanismos do metabolismo do nitrogênio (Randchenko *et al.*, 2013).

Dos 13 *spots* analisados, e que geraram espectros e consequentemente anotação presumível nos bancos de dados do Mascot, Uniprot e NCBI(Euphobiaceae), foram: receptor quinase, redutase ferredoxina nitrito, S2 proteína ribossomal 40S, Ribulose bifosfato carboxilase, ATP sintase, proteína de ligação a ubiquitina, fenilalanina aminoliasa, Dead-Box, citocinina dehidrogenase, subunidade II do fotosistema I, subunidade do fotosistema I. Essas proteínas estão localizadas ou envolvidas com rotas metabólicas no cloroplasto ou a ele relacionado.

A redução na expressão na proteína ribulose bifosfato carboxilase oxigenasse (RuBisCO) *spot 33*, no tratamento hídrico em relação ao controle foi aproximadamente 1,5 vezes, apesar dessa proteína ser a mais abundante nas folhas, é uma enzima responsável no metabolismo do carbono nas folhas, atuando como uma carboxilase do ciclo de Calvin ou como uma oxigenase na fotorrespiração.

Quando as plantas são submetidas a condição de déficit hídrico pode causar inativação reversível e irreversível de RuBisCO (Eckardt and Pell, 1995), ocorre uma rápida redução na quantidade de RuBisCO na maioria das plantas, que por sua vez conduz a uma menor atividade da enzima. Deficiência hídrica reduz a oferta de dióxido de carbono do ambiente devido ao fechamento dos estômatos, o que causa a diminuição de substrato para a carboxilação, e a redução na atividade do fator de acoplamento - ATPase. Em consequência, o aumento de fotorrespiração que asseguram reposição parcial do substrato para manter a função da RuBisCO carboxilante. A redução do volume do cloroplasto também pode estar ligada à dessecação dentro do cloroplasto, que conduz às mudanças conformacionais na RuBisCO. Além disso, as condições de estresse hídrico acidificar o estroma dos cloroplastos, causando a inibição da atividade RuBisCO (Lisar *et al.*, 2012).

Curiosamente, em nosso experimento observou-se uma diminuição nos níveis da proteína, em relação ao estressado, constituinte da subunidade 40S dos ribossomos.

No controle hídrico o espectro gerado através da análise no espectrômetro de massas, quando comparado com o banco Mascot detectou a proteína dirigente, que é responsável pela biossíntese de lignanas, flavonolignanos e

alcaloides, desempenhando assim um papel central no metabolismo vegetal secundário (Kim *et al.*, 2012). Entretanto, quando a mesma sequência foi comparada contra o banco de dados do NCBI/ Eupobiaceae, detectou-se a proteína ribossomal 30 S, responsável pelo processo de tradução em cloroplasto, que coincide com o resultado do peptídeo detectado na fração correspondente a do estressado hídrico. Sugere-se que nessa condição a planta, possivelmente, estava com a síntese ativa de proteína.

A partícula de reconhecimento de sinal nos cloroplastos apresenta a capacidade incomum para ligar e direcionar proteínas para membranas dos tilacoide (Hermkes *et al.*, 2006; Nick *et al.*, 2013). Essa proteína foi encontrada no fragmento 4, da amostra controle do hídrico, indicando que quando outras proteínas oriundas da síntese nuclear, importadas do citoplasma para o cloroplasto, podem fornecer condições favoráveis para executarem o correto funcionamento do aparelho fotossintético.

A proteína receptora de quinase, que foi mais expressa cerca de 4,5 vezes no estressado hídrico do que no controle provavelmente revela a resposta a percepção e transdução de sinais que é governada pela quinase. A ativação da cascata de sinalização intracelular regula as alterações bioquímicas e fisiológicas. As proteínas quinases são importantes fatores de transdução de sinal que têm um papel central na mediação da aclimação às alterações ambientais em organismos eucarióticos (Diédhiou *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2013).

A ferredoxina nitrito redutase é uma enzima que reduziu sua expressão no estressado hídrico em relação ao controle. O resultado observado de diminuição da expressão dessa proteína nos cloroplastos de pinhão-mansão pode indicar um decréscimo no fornecimento de nitrogênio para as células. É uma proteína que

atua como carreadoras de elétrons para o metabolismo no cloroplasto (Terauchi *et al.*, 2009), que é limitante no crescimento das plantas e pode reduzir as vias metabólicas no cloroplasto sob diversas condições de crescimento (Kherraz *et al.*, 2011).

A enzima ATP sintase subunidade alfa, enzima capaz de sintetizar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico durante a fosforilação oxidativa e a fotossíntese (Zhang *et al.*, 2006), foi exclusiva da condição controle (*spot* 89 -Tabela 5), e ATP sintase subunidade beta, *spot* 44 (Tabela 6), foi exclusiva na condição de estresse hídrico, em regiões opostas do gel. Em melancia selvagem (*Citrullus lanatus* L.) sob estresse hídrico, a análise do proteoma revelou que a subunidade ϵ da ATP sintase de cloroplasto ocorre em duas isoformas diferentes, com diferentes pontos isoelétricos, embora codificada por um único gene (Hoshiyasu *et al.*, 2013). Neste experimento, foram encontrados padrões distintos da ATP sintase, sugerindo que quando a planta de pinhão-mansão está sobre estresse hídrico, provavelmente a ATP sintase possa ter sofrido alguma modificação, como por exemplo, uma acetilação.

Algumas proteínas respondem aos estresses abióticos de forma semelhante, pois apareceram no estresse salino e no hídrico, logo alguns peptídeos anotados tiveram sempre correlação com respostas em ambos os estresses ambientais, como: citocinina dehidrogenase e Dead-box dependente de ATP (Tabela 5). Esses foram detectados apenas no estressado do hídrico (exclusivos) e no estressado salino e que podem conferir a tolerância ao estresse.

No *spot* 46, Tabela 6, exclusivo do estressado, verificou-se a expressão da putativa E3 ubiquitina ligase. A putativa E3 ubiquitina ligase têm sido detectada em várias respostas celulares ao estresse, e ao hormônio do ácido abscísico

(ABA), estudos com arroz verificaram que o mecanismo do proteassoma mediada pela resposta ao estresse, foram identificada a proteína E3-ubiquitina ligase com função na regulação da resposta ao estresse frio semelhante ao encontrado em *Arabidopsis* (Lourenço *et al.*, 2013). A expressão da E3 ubiquitina ligases exclusivamente na condição estressado do hídrico pode indicar que essa proteína participa do mecanismo de defesa contra as condições de seca, em resposta ao estresse por desidratação.

A fenilalanina amônia-liase foi exclusiva da condição estressada do hídrico, *spot* 51, Tabela 5. A fenilalanina amônia-liase é um precursor de vários metabólitos secundários, inclusive os flavonóides que pode ser considerado como um antioxidante, já que estabilizam radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Vila *et al.*, 2006).

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 e evitar a perda de água.

Os fotossistemas são complexos proteicos envolvidos na fotossíntese, que utilizam a luz para reduzir moléculas (Jonhson *et al.*, 2011). A subunidade II do fotossistema I, *spot* 85/ Tabela 5) foi detectada apenas no controle e sua inibição no tratamento do estresse hídrico sugere uma redução ou na inativação da mesma quando submetida a escassez de água.

Em suma, níveis diferentes de estresse foram utilizados neste estudo, assim como tratamentos diferentes, encontrando proteínas importantes que responderam ao estresse salino e ao déficit hídrico, incluindo ATPase e a

RuBisCO, que foram reguladas nas amostras estressadas. Estes resultados poderão ser úteis para uma maior compreensão dos mecanismos bioquímicos e moleculares de tolerância ao sal e ao déficit hídrico em pinhão-mansó.

Com base nos resultados encontrados foi possível traçar modelos esquemáticos da expressão ao déficit hídrico que resume tudo o que foi discutido anteriormente. (Figura 17).

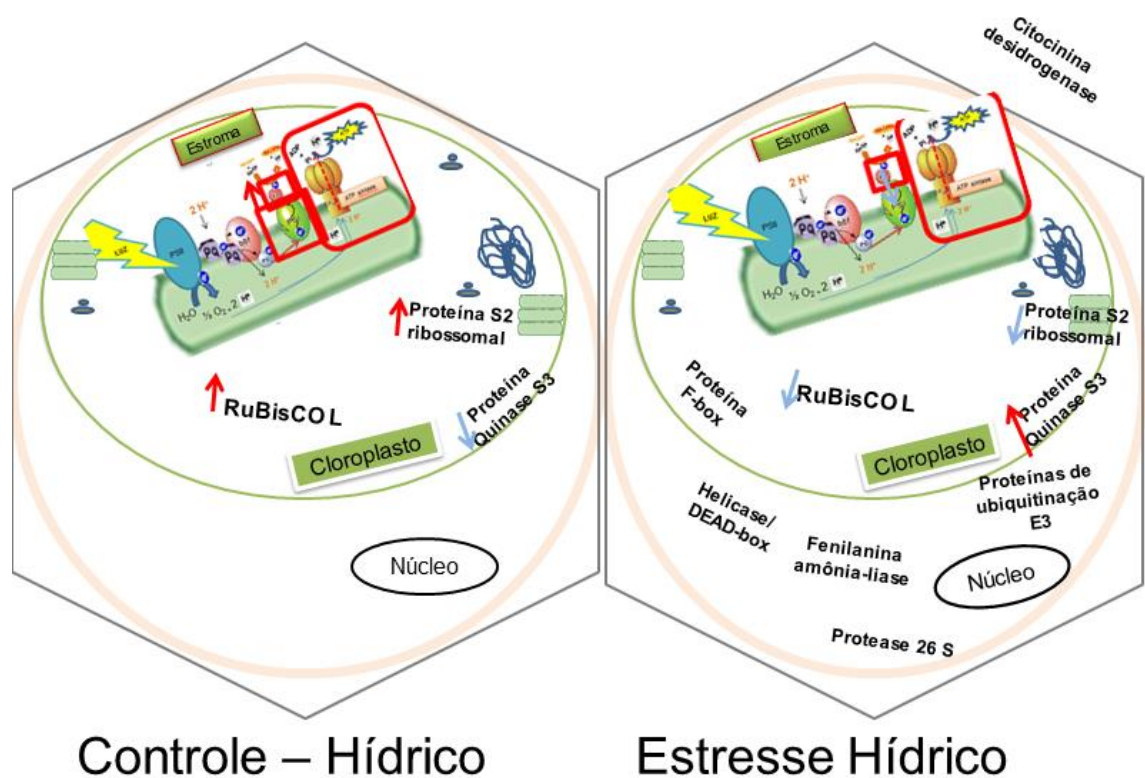


Figura 17. Representação esquemática da expressão de proteínas em pinhão-mansó sob déficit hídrico cultivada em casa de vegetação.

7. Conclusões

Este é o primeiro trabalho com protocolo de isolamento dos cloroplastos estabelecido neste trabalho a partir de pequena quantidade de material vegetal, permitiu a identificação de proteínas com expressão diferencial entre os tratamentos controle e sob estresse, podendo ser utilizado em trabalhos futuros envolvendo a purificação de cloroplasto.

A anotação presumível dos peptídeos cloroplastidiais selecionados foi relacionada com respostas ao estresse salino ou por déficit hídrico, indicando prováveis componentes moleculares de mecanismos de tolerância nesta organela.

As proteínas anotadas como protease 26S, citocinina desidrogenase, quinase S3, proteína F-box, quinase S3, Scar, Dead-box e ATP sintase (com expressão induzida sob estresse) são candidatas a estudos futuros visando aplicação como marcadores moleculares funcionais de tolerância ao estresse por salinidade e/ou déficit hídrico, buscando auxiliar os programas de melhoramento genético de pinhão-mansão.

8. Referências

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D and Shinozaki K (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9:1859–68.
- Aiyelaagbe O, Hamid A, Fattorusso, Taglialatela-Scafati O, Schroder H and Muller W (2011) Cytotoxic Activity of Crude Extracts as well as of Pure Components from *Jatropha* Species, Plants Used Extensively in African traditional Medicine. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011:134954.
- ANP (2012) Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, <http://www.anp.gov.br/?pg=61176&m=biodiesel&t1=&t2=biodiesel&t3=&t4=&ar=0&ps=1&cachebust=1346060056163> (August 12, 2012)
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:601-639.
- Araújo EL, Simabukuro EA, Nogueira RJMC, Lagôa AMMA and Melo AMY (2005) Estresses Ambientais: danos e/ou benefícios para as plantas. UFRPE, Recife, 499 pp.
- Atmodjo M, Sakuragi Y, Zhu X, Burrell A, Mohanty S, Atwood J, Orlando R, Scheller H and Mohnen D (2011) Galacturonosyltransferase (GAUT)1 and GAUT7 are the core of a plant cell wall pectin biosynthetic homogalacturonan: galacturonosyltransferase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:20225-30.
- Avni A, Avital and, Gromet-elhanan Z (1991) Reactivation of the chloroplast CF1-ATPase beta subunit by trace amounts of the CF1 alpha subunit suggests a chaperonin-like activity for CF1 alpha. *J Biol Chem* 266:7317-7320.
- Barrs HD and Weatherley PE (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust J Biol Sci* 15:413-428.
- Beltrão NEM, Severino LS, Suinaga FA, Veloso JF, Junqueira N, Fidelis M, Gonçalves NP, Saturnino HM, Roscoe R, Gazzoni D *et al.* (2006) Alerta sobre o plantio de pinhão manso no Brasil. CNPA/Embrapa, Campina Grande, 16 pp.
- Beltrão NEM and Oliveira MIP (2007) Biossíntese e Degradação de Lipídios, Carboidratos e Proteínas em Oleaginosas. CNPA/Embrapa, Campina Grande, 61 pp.
- Benko-Iseppon AM, Soares-Cavalcanti NM, Nogueira ACW, Silva LCB, Silva RRM, Almeida PML, Brunelli KR, Kido LMH and Kido EA (2005) Genes associados a estresses bióticos e abióticos em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e outras angiospermas. In: Araújo EL, Simabukuro EA, Nogueira RJMC, Lagôa AMMA and Melo AMY (org.) Estresses Ambientais: danos e/ou benefícios para as plantas. UFRPE, Recife, pp 350-359.
- Bestel-Corre G, Gianinazzi S and Dumas-gaudot E (2004) Impact of sewage sludges on *Medicago truncatula* symbiotic proteome. *Phytochemistry* 65:1651-9.
- Bolnet HJ and Jensen S (1996) Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol* 14:89-97.

- Book AJ, Gladman NP, Lee SS, Scalf M, Smith LM and Vierstra RD (2010) Affinity purification of the Arabidopsis 26 S proteasome reveals a diverse array of plant proteolytic complexes. *J Biol Chem* 285:25554-69.
- Boscariol –Carmago R, Berger I, Souza A, do Amaral A, Carlos E, Freitas-Astua J, Takita M, Targon ML, Medina C, Reis M and Machado M (2007) *In silico* analysis of ESTs from roots of Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck) under water stress. *Genet Mol Biol* 3:906-916.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Bricker TM and Frankel LK (2011) Auxiliary functions of the PsbO, PsbP and PsbQ proteins of higher plant Photosystem II: a critical analysis. *J Photochem Photobiol B* 104:165-78.
- Cabiscol E, Piulats E, Echave P, Herrero E and Ros J (2000) Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275:27393-8.
- Cavalcante UM (2001). Respostas fisiológicas em mudas de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis*. Sims f. *flavicarpa* Deg) inoculados com fungos micorrízicos arbusculares e submetidos a estresse hídrico. *Acta Bot Brasilica* 3:379-390.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L and Righetti PG (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25:1327-33.
- Cheng Y, Qi Y, Zhu Q, Chen X, Wang N, Zhao X, Chen H, Cui X, Xu L and Zhang W (2009) New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress. *Proteomics* 9:3100-14.
- Cheng MC, Hsieh EJ, Chen JH, Chen HY and Lin TP (2012) Arabidopsis RGLG2, functioning as a RING E3 ligase, interacts with AtERF53 and negatively regulates the plant drought stress response. *Plant Physiol* 158:363-75.
- Chellamuthu VR, Alva V and Forchhammer K (2013). From cyanobacteria to plants: conservation of PII functions during plastid evolution. *Planta* 237:451-62.
- Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF and Sanchez J.C (2009) The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis* 21:1104-15.
- Daher Z, Recorbet G, Valot B, Robert F, Balliau T, Potin S, Schoefs B, Denny R, Neeson K and Rennie C (2002) The use of search workflows in peptide assignment from MS/MS data. *J Biomol Tech*
- Desimone M, Henke A and Wagner E (1996) Oxidative Stress Induces Partial Degradation of the Large Subunit of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in Isolated Chloroplasts of Barley. *Plant Physiol* 111:789-796.
- Diédhiou CJ, Popova OV, Dietz K and Golldack D (2008) The SNF1-type serine/threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene expression in rice. *BMC Plant Biol* 8:49.
- Diekmann K, Hodkinson TR, Fricke E and Barth, S (2008) An optimized chloroplast DNA extraction protocol for grasses (Poaceae) proves suitable for whole plastid genome sequencing and SNP detection. *PLoS ONE* 3:e2813.

- Dubey RS (1997) Photosynthesis in plants under stressful conditions. In: Pessarakli M (ed.) Handbook of photosynthesis. Marcel Dekker, New York, pp 859-876.
- Eckardt NA and Pell EJ (1995) Oxidative modification of RuBisCO from potato foliage in response to ozone. *Plant Physiol Biochem* 33:273-282.
- Epstein E and Bloom A (2006) Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. Editora Planta, Londrina, 403 pp.
- Fan P, Wang X, Kuang T and Li Y (2009). An efficient method for the extraction of chloroplast proteins compatible for 2-DE and MS analysis. *Electrophoresis* 30:3024-3033.
- Farrokhi N, Whitelegge JP and Brusslan JA (2008) Plant peptides and peptidomics. *Plant Biotechnol J* 6:105-134.
- Faurobert M, Pelpoir E and Chaïb J (2007) Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods Mol Biol* 355:9-14.
- Feingold DS, Neufeld EF and Hassid WZ (1960) The 4-epimerization and decarboxylation of uridine diphosphate D-glucuronic acid by extracts from *Phaseolus aureus* seedlings". *J Biol Chem* 235:910-3.
- Ferreira A, Silva J and Ruiz HA (2010) Aspectos físicos e químicos de solos em regiões áridas e semiáridas. In: Gheyi HR, Dias NS, Lacerda CF (ed.) Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados, INCT Sal, Fortaleza, pp 21-41.
- Ferro M, Brugière S, Salvi D, Seigneurin-Berny D, Court M, Moyet L, Ramus C, Miras S, Mellal M, Legall S *et al.* (2010) AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol Cell Proteomics* 9:1063-84.
- Frank R (2002) High-density synthetic peptide microarrays: emerging tools for functional genomics and proteomics. *Comb Chem High Throughput Screen*, 5:429-40.
- Freitas R, Missio R, Matos F, Resende M and Dias L (2011) Genetic evaluation of *Jatropha curcas*: an important oilseed for biodiesel production. *Genet Mol Res* 10:1490-1498.
- Fricke W, Arova Ga, Wei W, Alexandersson E, Miller A, Kjellbom P, Richardson A, Wojciechowski T, Schreiber L, Veselov D *et al.* (2006). The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. *J Exp Bot, Plants and Salinity Special*, 57:1079-95.
- Gao L, Yan X, Li X, Guo G, Hu Y, Ma W and Yan Y (2011) Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Phytochemistry* 72:1180-91.
- Geserick C and Tenhaken R (2013) UDP-sugar pyrophosphorylase controls the activity of proceeding sugar-1-kinases enzymes. *Plant Signal Behav* 8:239-47.
- Gong D, Guo Y, Jagendorf AT and Zhu JK (2002) Biochemical characterization of the *Arabidopsis* protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiol* 130:256–264.
- Görg A, Weiss W and Dunn Mj (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4:3665-3685.
- Gorge A, Obermaler C, Boguth G and Weiss W (1999) Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* 20:712–7.

- Gygi Sp, Han Dk, Gingras, Ac, Sonenberg N and Aebersold R (1999) Protein analysis by mass spectrometry and sequence database searching: tools for cancer research in the post-genomic era. *Electrophoresis* 20:310-9.
- Hayashi T and Maclachlan G (1984) Biosynthesis of pentosyl lipids by pea membranes. *Biochem J* 217:791-803.
- Hankamer B and Barber J (1997) Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Plant Mol Biol* 48:641-71.
- Mahler H, Wuennenberg P, Linder M, Przybyla D, Zoerb C, Landgraf F and Forreiter C. Singlet oxygen affects the activity of the thylakoid ATP synthase and has a strong impact on its gamma subunit. *Planta* 225:1073-83.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK and Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:463-499.
- Hernández J, Escobar S, Creissen G and Mullineaux P (2004) Role of hydrogen peroxide and the redox state of ascorbate in the induction of antioxidant enzymes in pea leaves under excess light stress. *Funct Plant Biol* 31:359-368.
- Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H and Sakakibara H (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot* 59:75-83.
- Hoagland D and Arnon D (1950) The water culture method of growing plants without soil. Berkeley, University of California, 32 pp.
- Hörmann F, Soll J and Bölter B (2007) The Chloroplast Protein Import Machinery: A Review. *Methods Mol Biol* 619:307-21.
- Hoshiyasu S, Kohzuma K, Yoshida K, Fujiwara M, Fukao Y, Yokota A and Akashi K (2013) Potential involvement of N-terminal acetylation in the quantitative regulation of the ϵ subunit of chloroplast ATP synthase under drought stress. *Biosci Biotechnol Biochem* 77:998-1007.
- Hurkman W and Tanaka C (1986) Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Plant Physiol* 81:802-806.
- Hussain A, Khan Z, Ashraf M, Rashid M and Akhtar M (2004) Effect of salt stress on some growth attributes of sugarcane cultivars CP-77-400 and COJ-84. *Int J Agric Biol* 6:188-191.
- Ifuku K, Yamamoto Y, Ono TA, Ishihara S and Sato F (2005) PcbP protein, but not PsbQ protein, is essential for the regulation and stabilization of photosystem II in higher plants. *Plant Physiol* 139:1175-1184.
- Jamil S, Abhilash P, Singh N and Sharma PN (2009) *Jatropha curcas* L: A potential crop for phytoremediation of coal fly ash. *J Hazard Mater* 172:269-275.
- Johnson EA (2008) Altered expression of the chloroplast ATP synthase through site-directed mutagenesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth Res* 96:153-162.
- Jongschaap R, Corre W, Bindraban P and Brandenburg W (2007) Claims and facts on *Jatropha curcas* L. *Plant Research International*, 42 pp.
- Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J and Rolland N (2009) Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Mol Plant* 2:1154-80.
- Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J and Rolland N (2010) Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism. *Prog Lipid Res* 49:128-58.

- Kamal AH, Cho K, Kim DE, Uozumi N, Chung KY, Lee SY, Choi JS, Cho SW, Shin CS and Woo SH (2012) Changes in physiology and protein abundance in salt-stressed wheat chloroplasts. *Mol Biol Rep* 39:9059-9074.
- Kaushik N, Kumar K, Kumar S, Kaushikb N and Royb S (2007) Genetic variability and divergence studies in seed traits and oil content of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) accessions. *Biomass Bioenergy* 31:497-502.
- Kakiuchi S, Uno C, Ido K, Nishimura T, Noguchi T, Ifuku K and Sato F (2012) The PsbQ protein stabilizes the functional binding of the PsbP protein to photosystem II in higher plants. *Biochim Biophys Acta* 1817:1346-51.
- Kazenwadel C, Klebensberger J, Richter S, Pfannstiel J, Gerken U, Pickel B, Schaller A and Hauer B (2012) Optimized expression of the dirigent protein AtDIR6 in *Pichia pastoris* and impact of glycosylation on protein structure and function. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:7215-27.
- Kim KW, Moinuddin SG, Atwell KM, Costa MA, Davin LB and Lewis NG (2012) Opposite stereoselectivities of dirigent proteins in *Arabidopsis* and *schizandra* species. *J Biol Chem* 287:33957-72.
- Konno H, Murakami-Fuse T, Fujii F, Koyama F, Ueoka-Nakanishi H, Pack CG, Kinjo M and Hisabori T (2006) The regulator of the F1 motor: inhibition of rotation of cyanobacterial F1-ATPase by the subunit. *EMBO J* 25:4596-4604.
- Kotera E, Tasaka M and Shikanai T (2005) A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplast. *Nature* 433:326-330.
- Kurepa J, Wang S, Li Y and Smalle J (2009) Proteasome regulation, plant growth and stress tolerance. *Plant Signal Behav* 4:924-7.
- Kley J, Heil M, Muck A, Svatos A and Boland W (2010) Isolating intact chloroplasts from small *Arabidopsis* samples for proteomic studies. *Anal Biochem* 398:198-202.
- Kherraz K, Kherraz K and Kameli A (2011) Homology modeling of Ferredoxin-nitrite reductase from *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformation* 6:115-9.
- Krishania S, Dwivedi P and Agarwal K (2013) Strategies of adaptation and injury exhibited by plants under a variety of external conditions: a short review. *Comunicata Scientiae* 4:103-110.
- Krügel U and Kühn C (2013) Post-translational regulation of sucrose transporters by direct protein-protein interactions. *Front Plant Sci* 4:237.
- Larcher W, (2000) *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos, Rima, 531 pp.
- Laviola B, Alves A, Gurgel F, RosadoT, Rocha R and Albrecht J (2012) Estimates of genetic parameters for physic nut traits based in the germplasm two years evaluation. *Ciência Rural* 42:429-435.
- Lauchli A and Grattan S (2007) Plant growth and development under salinity stress. In: Jenks MA, Hasegawa PM and Jain SM (eds) *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer, pp 285-315.
- Lechner E, Achard P, Vansiri A, Potuschak T and Genschik P (2006) F-box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol* 9:631-8.
- Lee K, Marshall R, Slivicke L and Vierstra R (2012) Genetic analyses of the *Arabidopsis* 26S proteasome regulatory particle reveal its importance during light stress and a specific role for the N-terminus of RPT2 in development. *Plant Signal Behav* 7:973-8.
- Lehninger A, Nelson D, Cox M, Simões A and Lodi W (2006) *Princípios de bioquímica*. 4. ed. São Paulo, Sarvier, pp 1202.

- Lisar S, Motafakkerazad R, Hossain M and Rahman I (2012) Water Stress in plants causes, effects and responses. Agricultural and Biological Sciences, InTech, 14 pp.
- Liu H, Liu Y, Yang M and Shen S (2009) A comparative analysis of embryo and endosperm proteome from seeds of *Jatropha curcas*. J Integr Plant Biol 51:850–857.
- Liu H, Wang C, Komatsu S, He M, Liu G and Shen S (2013) Proteomic analysis of the seed development in *Jatropha curcas*: From carbon flux to the lipid accumulation. J Proteomics 91:23-40.
- Lourenço T, Sapeta H, Figueiredo DD, Rodrigues M, Cordeiro A, Abreu IA, Saibo NJ and Oliveira MM (2013) Isolation and characterization of rice (*Oryza sativa* L.) E3-ubiquitin ligase OsHOS1 gene in the modulation of cold stress response. Plant Mol Biol 1573-5028.
- Machado C, Schmidt P and Medina C Ribeiro R (2005) Respostas da fotossíntese de três espécies de citros a fatores ambientais. Pesq Agropec Brás 40:1161-1170.
- Macková H, Hronková M, Dobrá J, Turecková V, Novák O, Lubovská Z, Motyka V, Haisel D, Hájek T, Prášil IT *et al.* (2013). Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. J Exp Bot 64:2805-15.
- Macovei A and Tuteja N (2012). microRNAs targeting DEAD-box helicases are involved in salinity stress response in rice (*Oryza sativa* L.). BMC Plant Biol 12:183
- Macovei A, Vaid N, Tula S and Tuteja N (2012) A new DEAD-box helicase ATP-binding protein (OsABP) from rice is responsive to abiotic stress. Plant Signal Behav 7:1138-43.
- Mahler H, Wunnenberg P and Linder M (2007) Singlet oxygen affects the activity of the thylakoid ATP synthase and has a strong impact on its g subunit. Planta 225:1073-1083.
- Mariac C, Trouslot P, Poteaux C, Bezançon G and Renno JF (2000) Chloroplast DNA extraction from herbaceous and woody plants for direct restriction fragment length polymorphism analysis. Biotechniques 28:110-3.
- Maurel C, Verdoucq L, Luu D and Santoni V (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. Annu Rev Plant Biol 59: 595-624.
- Méchin V, Consoli L, Le-Guilloux M and Damerval C (2003). An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. Proteomics 3:1299-302.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci 9:405-410.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S and Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. Plant Cell Environ 33:453-467.
- Moeder W, Del Pozo O, Navarre DA, Martin GB and Klessig DF (2007) Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana. Plant Mol Biol 63:273-87.
- Mohnen D (2008) Pectin structure and biosynthesis. Curr Opin Plant Biol 11:266-77.
- Molecular Techniques and Methods (2001) Isolation of Chloroplasts and Chloroplast DNA. Institute of Molecular Development LLC, <http://www.molecularinfo.com/MTM/C/C3/C3-4/C3-4-2.html> (August, 2011).

- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25:239-250.
- Munns R and Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59:651-681.
- Navarre DA, Wendehenne D, Durner J, Noad R and Klessig DF (2000) Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiol* 122:573-82.
- Nogueira RJM, Moraes J, Burity HE (2000) Curso diário e sazonal das trocas gasosas e do potencial hídrico foliar em aceroleiras. *Pesq Agropec Brás* 35:331-1342.
- Ning Y, Jantasuriyarat C, Zhao Q, Zhang H, Chen S, Liu J, Liu L, Tang S, Park CH, Wang X et al. (2011) The SINA E3 ligase OsDIS1 negatively regulates drought response in rice. *Plant Physiol* 157:242-55.
- Odonne G, Berger F, Stien D, Grenand P and Bourdy G (2011) Treatment of leishmaniasis in the Oyapock basin (French Guiana): A K.A.P. survey and analysis of the evolution of phytotherapy knowledge amongst Wayãpi Indians. *J Ethnopharmacol* 137:1228-39.
- Osoniyi O and Onajob F (2003) Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. *J Ethnopharmacol* 89:101-105.
- Ohnishi T, Godza B, Watanabe B, Fujioka S, Hategan L, Ide K, Shibata K, Yokota T, Szekeres M and Mizutani M (2012) CYP90A1/CPD, a brassinosteroid biosynthetic cytochrome P450 of Arabidopsis, catalyzes C-3oxidation. *J Biol Chem* 287:31551-60.
- Paquis S, Mazeyrat-Gourbeyre F, Fernandez O, Crouzet J, Clément C, Baillieul F and Dorey S (2011) Characterization of a F-box gene up-regulated by phytohormones and upon biotic and abiotic stresses in grapevine. *Mol Biol Rep* 38:3327-37.
- Pickel B, Pfannstiel J, Steudle A, Lehmann A, Gerken U, Pleiss J and Schaller A (2012) A model of dirigent proteins derived from structural and functional similarities with allene oxide cyclase and lipocalins. *FEBS J* 279:1980-93.
- Pfalz J, Liebers M, Hirth M, Grübler B, Holtzegel U, Schröter Y, Dietzel L and Pfannschmidt T (2012) Environmental control of plant nuclear gene expression by chloroplast redox signals. *Front Plant Sci* 19:257.
- Prisco JT (1980) Alguns aspectos da fisiologia do estresse salino. *Revista Brasileira de Botânica* 2:85-94.
- Radchenko MV, Thornton J, Merrick M (2013) PII signal transduction proteins are ATPases whose activity is regulated by 2-oxoglutarate. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:12948-53.
- Richter CV, Träger C and Schünemann D (2008) Evolutionary substitution of two amino acids in chloroplast SRP54 of higher plants cause its inability to bind SRP RNA. *FEBS Lett* 582:3223-9.
- Rodrigues RA (2006). Biodiesel no Brasil: diversificação energética e inclusão social com sustentabilidade. In: Ferreira JR, Cristo CMPN O futuro da indústria: biodiesel. Brasília, MDIC-STI/IEL, 145 pp.
- Roesler KR, Savage LJ, Shintani KD, Shorrosh SB and John OB (1996) Co-purification, co-immunoprecipitation, and coordinate expression of acetyl-coenzyme A carboxylase activity, biotin carboxylase, and biotin carboxyl carrier protein of higher plants. *Planta* 198:517-525.
- Rosa I, Dillenburg I and Forseth I (1991) Responses of soybean leaf angle, photosynthesis and stomatal conductance to leaf and soil water potential. *Ann Bot* 67:51-8.

- Rutschow H, Ytterberg AJ, Friso G, Nilsson R and van Wijk KJ (2008) Quantitative proteomics of a chloroplast SRP54 sorting mutant and its genetic interactions with CLPC1 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 148:156-75.
- Rhoades J, Kandiah A, Mashali A, (2000) Uso de águas salinas para produção agrícola. Campina Grande, UFPB, 117 pp.
- Sairam R and Saxena D (2000) Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: Possible mechanism of water stress tolerance. *J Agron Crop Sci* 184:55-61.
- Sairam R and Tyagi A (2004) Physiological and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr Sci* 86:407-420.
- Seemann JR and Critchley C (1985) Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 164:151-162.
- Seidler A (1996) The extrinsic polypeptides of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1277:35-60.
- Silva EN, Ferreira-Silva, SI, Fontenele AD, Ribeiro RV; Viegas RA and Silveira JA (2010) Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. *J Physiol* 167:1157-1164.
- Silva FA and Azevedo CA (2002) Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Rev Bras Prod Agroind* 4:71-78.
- Singh B, Avci U, Eichler ISE, Grimson MJ, Landgraf J, Mohnen D, Sorensen I, Wilkerson CG, Willats WG, Haigler CH (2009) A specialized outer layer of the primary cell wall joins elongating cotton fibers into tissue-like bundles. *Physiol* 150:684-99.
- Somerville C, Browse J, Jaworski J and Ohlrogge J. Lipids In: Buchanan B, Gruissem W and Jones R (2000) *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville. American Society of Plant Physiologist 10:456.
- Souza CC, Oliveira FA, Silva IF and Amorim Neto MS (2000) Avaliação de métodos determinação de água disponível e manejo da irrigação em terra roxa sob cultivo de algodoeiro herbáceo. *Rev Bras Eng Agríc Ambient* 4:338-342.
- Souza R, Soares M and Regina A (2001) Trocas gasosas de mudas de videira, obtidas por dois porta-enxertos, submetidas à deficiência hídrica. *Pesq Agropec Bras* 36:1221-1230.
- Sung TY, Tseng CC and Hsieh MH (2010) The SLO1 PRR protein is required for RNA editing at multiple sites with similar upstream sequences in *Arabidopsis* mitochondria. *Plant J* 63:499-511.
- Schmülling T, Werner T, Riefler M, Krupková E and Bartrina y Manns I (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J Plant Res* 116:241-52.
- Scholander PF, Hammel H, Hemmingsen E and Bradstreet EI (1965) Hydrostatic pressure and osmotic potentials in leaves of mangroves and some other plants. *PNAS* 51:119-125.
- Schumann N, Navarro-Quezada A, Ullrich K, Kuhl C and Quint M (2011) Molecular evolution and selection patterns of plant F-box proteins with C-terminal kelch repeats. *Plant Physiol* 155:835-50.
- Scandalios JG (2002) The rise of ROS. *Trends Biochem Sci* 27:483-6.
- Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (1966) Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol* 7:161-7.

- Sweetlove LJ, Heazlewood JL, Herald V, Holtzapffel R, Day DA, Leaver CJ and Millar AH (2002) The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria. *Plant J* 32:891-904.
- Taiz L and Zeiger E (2009) *Fisiologia Vegetal*. 4.ed. Porto Alegre, Artmed, pp. 719.
- Taiz L and Zeiger E (2009) *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre, Artmed, pp. 819.
- Taylor I, Seitz K, Bennewitz S and Walker JC (2013) A simple in vitro method to measure autophosphorylation of protein kinases. *Plant Methods* 9:22.
- Tikhonov AN (2013) pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynth Res*, 22.
- Tuteja N and Tuteja R (2004) Prokaryotic and eukaryotic DNA helicases. Essential molecular motor proteins for cellular machinery. *Eur J Biochem* 271:1835-48.
- Triboush S, Danilenko N and Davydenko O (1998) A Method for Isolation of Chloroplast DNA and Mitochondrial DNA from Sunflower. *Plant Mol Biol Rep* 16:183-189.
- Uchida H, Sugiyama R, Nakayachi O, Takemura M and Ohyama K (2007) Expression of the gene for sterol-biosynthesis enzyme squalene epoxidase in parenchyma cells of the oil plant, *Euphorbia tirucalli*. *Planta* 226:1109-15.
- Uhrig F, Mutondo M, Zimmermann I, Deeks MJ, Machesky LM, Thomas P, Uhrig S, Rambke C, Hussey PJ and Hülkamp M (2007) The role of Arabidopsis SCAR genes in ARP2-ARP3-dependent cell morphogenesis. *Development* 134:967-77.
- Van Wijk K, Peltier J and Giacomelli L (2007) Isolation of Chloroplast Proteins from Arabidopsis thaliana for Proteome Analysis. In: Thiellement H, Zivy M, Damerval C and Méchin V *Plant Proteomics - Methods and Protocols*. Springer Protocols 43-48 pp.
- Way DA and Sage RF (2008) Thermal acclimation of photosynthesis in black spruce *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. *Plant Cell Environ* 31:1250-1262.
- Wang C, Zhang L, Yuan M, Ge Y, Liu Y, Fan J, Ruan Y, Cui Z, Tong S and Zhang S (2010) The microfilament cytoskeleton plays a vital role in salt and osmotic stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Biol (Stuttg)* 12:70-78
- Wang D, Li XF, Zhou ZJ, Feng XP, Yang WJ and Jiang DA (2010) Two RuBisCO activase isoforms may play different roles in photosynthetic heat acclimation in the rice plant. *Physiol Plant* 139:55-67.
- Wang XC, Li XF, Deng X, Han HP, Shi WI and Li YX (2007) A protein extraction method compatible with proteomic analysis for euhalophyte *Salicornia europaea* L. *Electrophoresis* 28:3976-3987.
- Werner T and Schmulling T (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 12:527 -538
- Xu D, Huang W, Li Y, Wang H, Huang H and Cui X (2012) Elongator complex is critical for cell cycle progression and leaf patterning in Arabidopsis. *Plant J*. 69:792-808.
- Yagi Y, Tachikawa M, Noguchi H, Satoh S, Obokata J and Nakamura T (2013) Pentatricopeptide repeat proteins involved in plant organellar RNA editing. *RNA Biol* 3:10.
- Yan SP, Zhang QY, Tang ZC, Su WA and Sun WN (2006) Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Mol Cell Proteomics* 5:484-96.

- Yang MF, Liu YJ, Liu Y, Chen H, Chen and Shen Sh (2009) Proteomic Analysis of Oil Mobilization in Seed Germination and Postgermination Development of *Jatropha curcas*. *J Proteome Res* 8:1441-1451.
- Ye M, Li C, Francis G and Harinder PSM (2009) Current situation and prospects of *Jatropha curcas* as a multipurpose tree in China. *Agroforest Syst* 76:487-497.
- Yen C, Stone S, Koliwad S, Harris C and Farese R (2008) Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of Lipid Research*, Memphis 49: 2283-301
- Yi X, Hargett SR, Frankel LK and Bricker TM (2006) The PsbQ protein is required in *Arabidopsis* for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy under low light conditions. *J Biol Chem* 281:26260-26267.
- Yu QB, Jiang Y, Chong K and Yang ZN (2009) AtECB2, a pentatricopeptide repeat protein, is required for chloroplast transcript accD RNA editing and early chloroplast biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 59:1011-23.
- Yuan H and Liu D (2012) Functional disruption of the pentatricopeptide protein SLG1 affects mitochondrial RNA editing, plant development, and responses to abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant J* 70:432-44.
- Zörb C, Herbst R, Forreiter C and Schubert S (2009) Short-term effects of salt exposure on the maize chloroplast protein pattern. *Proteomics* 9:4209-4220.
- Zhang X, Takano T and Liu S (2006) Identification of mitochondrial ATP synthase small subunit gene (*RmtATP6*) expressed in response to salts osmotic stresses in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot* 57:193-200.
- Zhang Y, Wang Y, Jiang L, Xu Y, Wang Y, Lu D and Chen F (2007) Aquaporin JcPIP2 is involved in drought responses in *Jatropha curcas*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 39:787-794.
- Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* 6:66-71.
- Zhu JK (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr Opin Plant Biol* 4:401-406.

9. Curriculum Vitae (LATTES)

Nome: Regina Elisabety Oliveira Folha

Data de nascimento: 21/07/1988

e-mail: regina_folha@hotmail.com

Bióloga pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, 2010). É aluna do Programa de Pós-Graduação em Genética (Mestrado) na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética. Atua na área de Genética, com ênfase em Biologia Molecular de Plantas, atuando principalmente nos seguintes temas: Genômica, Expressão Gênica, Proteômica, Pinhão-Manso.

Formação Complementar

2011 - 2011

Curso de Verão em Bioinformática. (Carga horária: 40h).

Universidade de São Paulo.

Resumos publicados em anais de congressos

FOLHA, R. E. O. ; PESTANA-CALSA, M.C ; ALMEIDA, R. R. ; CALSA JUNIOR, T. Leaf Proteomics of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) in Response to Nutritional Deficit. In: III Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2011, Ilhéus - BA. III Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2011.

CHAGAS, M. ; SOUZA, S. C. ; FREITAS, G. ; NASCIMENTO, J. M. ; **FOLHA, R. E. O.** ; CAVALCANTI, M. S. . Fungos endofíticos isolados das folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers). In: VI Congresso Brasileiro de Micologia, 2010, Brasília. VI Congresso Brasileiro de Micologia, 2010.

Apresentações de Trabalho

FOLHA, R. E. O. ; CALSA JUNIOR, T ; PESTANA-CALSA, M.C ; PENA, E. P. N. . Two-dimensional Proteome mapping of Physic Nut (*Jatropha Curcas* L.) chloroplast. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SOUZA, J. M. ; SOUZA, A. E. R. ; **FOLHA, R. E. O.** ; BARBOSA NETO, A. G. ; SILVA, M. F. L. T. ; OLIVEIRA, R. S. ; PESTANA-CALSA, M.C ; CALSA JUNIOR, T . OPTIMIZATION OF PROTOCOL FOR PURIFICATION OF CELL WALL PROTEOME OF LEAF IN SUGARCANE. 2012. (Apresentação de Trabalho/Outra).

BARBOSA NETO, A. G. ; **FOLHA, R. E. O.** ; PACHECO, C. M. ; ALMEIDA, R. R. ; PESTANA-CALSA, M.C ; MORAIS JR, M. A. D. E. ; CALSA JUNIOR, T . PROTEOME EXTRACTION FROM YEAST *DEKKERA BRUXELLENSIS* FOR ANALYSIS BY TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS.. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

PENA, E. P. N. ; **FOLHA, R. E. O.** ; PACHECO, C. M. ; SOUZA, A. E. R. ; LIRA, N. P. V. ; PESTANA-CALSA, M.C ; CALSA JUNIOR, T . ANALISE

CLOROPLASTIDIAL DE SORGO RELACIONADO À SÍNTESE DE CARBOIDRATOS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

SOUZA, A. E. R. ; PACHECO, C. M. ; **FOLHA, R. E. O.** ; LIRA, N. P. V. ; SANTOS, L. M. ; ALMEIDA, R. R. ; PESTANA-CALSA, M.C ; CALSA JUNIOR, T . Differential peptides from salt-sensitive sugarcane roots. 2011. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

GOMES, N. O. C. ; **FOLHA, R. E. O.** ; LIRA, N. P. V. ; MANSO, T. C. ; PACHECO, C. M. ; SOUZA, A. E. R. ; ALMEIDA, R. R. ; PESTANA-CALSA, M.C ; CALSA JUNIOR, T . In silico transcriptome matching of mass-spectrometry-derived protein sequence associated to salinity tolerance in sugarcane roots. 2011. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

PACHECO, C. M.; **FOLHA, R. E. O.** ; SOUZA, A. E. R. ; LIRA, N. P. V. ; SANTOS, L. M. ; ALMEIDA, R. R. ; PESTANA-CALSA, M.C ; CALSA JUNIOR, T . Proteomics of drought-tolerant sugarcane roots under salinity. 2011. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

MANSO, T. C.;**FOLHA, R. E. O.**; SOUZA, A. E. R. ; CALSA JUNIOR, T . TOWARDS COWPEA CHLOROPLAST GENOME ASSEMBLY. 2011. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

FOLHA, R. E. O. ; PESTANA-CALSA, M.C ; ALMEIDA, R. R. ; NOGUEIRA, R. J.
M. C. R. ; CALSA JUNIOR, T . DIFFERENTIAL PEPTIDES FROM SALT
SENSITIVE SUGARCANE ROOTS. 2011. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).