**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Análise proteômica de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) em resposta ao
cádmio**

Mônica Regina Franco

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em
Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de
Plantas

**Piracicaba
2013**

Mônica Regina Franco
Bióloga

Análise proteômica de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) em resposta ao cádmio

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Franco, Mônica Regina

Análise proteômica de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) em resposta ao cádmio / Mônica Regina Franco.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
87 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Tomate 2. Metais pesados 3. Tolerância ao estresse 4. Estresse oxidativo
5. Eletroforese bidimensional (2-DE) I. Título

CDD 632.752
F825a

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICO a todos os meus mestres,
Aqueles que me ensinaram a escrever as primeiras palavras,
Revelaram-me como é glorioso transmitir o conhecimento e
Como é árduo ser responsável pelo futuro da nação sem o devido valor.
Lá da frente da sala de aula me mostraram onde eu queria estar!
Sem eles, de maneira alguma, poderia chegar até aqui,
Pois foram eles que me deram os tijolos para que eu pudesse construir meu caminho.

OFEREÇO a meus pais, que me deram a melhor base familiar e por me depositarem
toda sua confiança,
Aos meus irmãos e cunhados por sempre me incentivarem,
Ao meu namorado por me dar apoio,
E aos meus sobrinhos por me proporcionarem momentos simples, de pura paz e alegria.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente meu orientador, Prof. Ricardo, obrigado por confiar em mim, e me acolher entre seus orientados. Tenho grande orgulho de poder ter sido orientada por uma pessoa tão grandiosa, profissionalmente e pessoalmente.

Agradeço à Salete Gaziola, por sempre estar do nosso lado, nos ajudando da melhor forma possível em todos os momentos necessários. Sem você, nosso lab. não seria o mesmo.

Agradeço especialmente ao colega de laboratório e amigo Fernando Piotto, sem o qual não poderia ter desenvolvido esse projeto. Obrigada por seus conselhos e orientações!

Agradeço aos colegas Daiana, Lucas e Luis Felipe pelas discussões sobre a técnica 2-DE, que fizeram toda a diferença!

Aos meus colegas de laboratório, os quais foram muito importantes nessa caminhada, me ajudando a amadurecer de diversas formas. Meu muito obrigada a Aline, Amerivan, Berenice, Carolina, Deived, Daniel, Fabiana, Flávia, Georgia, Jackeline, Manuella, Milca, Paula, Priscila, Roberta, Rogério, Sandra, Tiago, Vanessa e Vinícius.

Às amigas inestimáveis Gicka, Lucélia e Xiuá, pelo companheirismo nas horas boas e ruins, por compartilhar a “xaranguisse” de todos os dias e pelas experiências profissionais transmitidas.

Ao Departamento de Genética, todos os seus professores e funcionários, agradeço pela estrutura e conhecimentos transmitidos.

À ESALQ/USP, por permitir que eu também faça parte da história dessa escola centenária e de tão estimada valia para nosso país.

À CNPq pela concessão de bolsa, e também a CAPES e FAPESP pelo apoio a pesquisa.

“Ao iniciarmos com certezas, terminaremos em dúvidas; mas, se iniciarmos com dúvidas e formos persistentes, encontraremos as certezas.”

(Francis Bacon, 1561-1626)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Metais pesados e sua relação com as plantas	21
2.2 Toxicidade do Cd em vegetais	22
2.3 Estudo proteômico da resposta ao estresse.....	24
2.3.1 Análise proteômica em Eletroforese Bidimensional (2-DE)	27
2.4 Tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) como modelo de estudo.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Material vegetal.....	31
3.2 Modelo experimental.....	31
3.3 Delineamento experimental e tratamentos	33
3.4 Massa seca e quantificação de Cd	34
3.5 Quantificação de malondialdeído (MDA) resultante da peroxidação lipídica	35
3.6 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	35
3.7 Perfil protéico por eletroforese bidimensional	35
3.7.1 Métodos de extração de proteínas solúveis totais	35
3.7.2 Extração de proteínas solúveis totais por método TCA/Acetona	37
3.8 Solubilização e determinação da concentração das proteínas solúveis totais	37
3.9 Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	38
3.10 Análise do perfil protéico em gel por eletroforese bidimensional (2-DE)	38
3.10.1 Primeira dimensão: Focalização isoeletrica das proteínas	38
3.10.2 Segunda dimensão: Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.....	42
3.10.3 Análise e tratamento das imagens digitalizadas do gel	43
3.10.4 Armazenamento dos <i>spots</i> diferencialmente expressos.....	43
3.11 Análises estatísticas	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Extração de proteínas de tomateiro e resolução em géis 2-DE: teste com a cultivar modelo MT	45

4.2	Avaliação do efeito do Cd nas cultivares de tomateiro	49
4.2.1	Impacto do Cd no desenvolvimento das cultivares CR e PR.....	49
4.2.2	Taxa de crescimento das cultivares expostas ao Cd	51
4.2.3	Acúmulo de Cd nos tecidos	54
4.2.4	Estresse oxidativo induzido pelo Cd	55
4.3	Análise do proteoma das cultivares PR e CR.....	59
4.3.1	Análise da expressão dos <i>spots</i> em eletroforese bidimensional	60
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
	REFERÊNCIAS	79

RESUMO

Análise proteômica de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) em resposta ao cádmio

Atualmente a contaminação ambiental é um problema mundial. A contaminação do solo por metais pesados tem aumentado nos últimos anos, estando associada à demandas de tecnologias que exigem esses elementos contaminantes. O cádmio (Cd) é um elemento normalmente encontrado em baixas concentrações na natureza, sendo altamente tóxico para microrganismos, plantas e animais. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo analisar as modificações no perfil protéico de duas cultivares de tomateiro, cv. Calabash Rouge (CR) e cv. Pusa Ruby (PR), submetidas a 50 μM de CdCl_2 em sistema de hidroponia. Diferentes métodos de extração de proteínas para as análises de eletroforese bidimensional (2-DE) foram conduzidas (Fenol; TCA/Acetona; Tris-base; Tris/TCA). O método TCA/Acetona foi o mais eficiente, apresentando maior rendimento total protéico (mg gMF^{-1}), padronização e abundância de proteínas, e alta resolução no perfil protéico. Após a exposição das plantas ao Cd, foram realizadas análises de taxa de crescimento, índice de tolerância, quantificação do conteúdo de Cd, malondialdeído (MDA) e H_2O_2 nos tecidos vegetais. Os resultados indicaram que plantas submetidas a 50 μM CdCl_2 acumularam Cd em seus tecidos, e mostraram-se mais estressadas comparadas as plantas controle, evidenciado por alterações em aspectos morfológicos principalmente na cultivar CR. Na presença de Cd o conteúdo de MDA exibido no tecido foliar da cv. PR foi menor comparado a cultivar CR, o que pode indicar, de forma indireta, maior eficiência do sistema antioxidante da cv. PR. O conteúdo de H_2O_2 apresentou aumento em ambos tecidos e cultivares na presença de Cd. O índice de tolerância confirmou que a cv. PR é mais tolerante ao Cd em comparação a cv. CR. Análises de eletroforese bidimensional (2-DE) indicaram alterações no perfil protéico das duas cultivares avaliadas quando expostas ao Cd. Assim, a identificação de *spots* diferencialmente expressos pode revelar novas proteínas relacionadas à tolerância e sensibilidade ao Cd e outros metais pesados em plantas cultivadas.

Palavras-chave: Tomate; Metais pesados; Tolerância ao estresse; Estresse oxidativo; Eletroforese bidimensional (2-DE)

ABSTRACT

Proteomic analysis of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) in response to cadmium

Environmental contamination is currently a global problem. Soil contamination by heavy metals has increased in more recent years, associated to demands of technologies that require these contaminant elements. Cadmium (Cd) is an element usually found in low concentrations in nature, being very toxic for microorganisms, plants and animals. Thereby, this study aimed to identify changes in protein profile of two cultivars of tomato, cv Calabash Rouge (CR) e cv Pusa Ruby (PR), under 0 and 50 mM of CdCl₂ in hydroponics system. Different protein extraction methods for two-dimensional electrophoresis (2-DE) were performed (Phenol, TCA /Acetone; Tris base, Tris /TCA). The TCA /Acetone method was the most effective for root and leaf tissues, obtaining the highest protein yield (mg GMF⁻¹), standardization, abundance and high-resolution of protein profile. After plant exposition to Cd, we performed analysis of growth rate, tolerance index, measurement of Cd content, measurements of malondialdehyde (MDA) and H₂O₂ content in plant tissues. The results showed that the plants submitted to 50 mM of CdCl₂ accumulated Cd in their tissues, presenting more stress than the control plants, which was reflected in morphological symptoms, especially in cv CR. In the presence of Cd the MDA content displayed in cv. PR leaf tissue was lower than cv CR, which may indicate, indirectly, an antioxidant system more efficient in cv PR. The H₂O₂ content showed an increase in both tissues and cultivars under Cd presence. The tolerance index confirmed that the cv. PR is more tolerant to Cd, compared to cv. CR. Two dimensional electrophoresis (2-DE) analyses were performed and demonstrated alterations in protein profile of the two cultivars when exposed to Cd. Thus, the identification of differentially expressed spots may show new proteins related to tolerance and sensitivity to Cd and other heavy metals in plants.

Keywords: Tomato; Heavy metal; Stress tolerance; Oxidative stress; Two dimensional electrophoresis (2-DE)

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

% vol - **Porcentagem de volume**

$^1\text{O}_2$ - **Oxigênio “singlet”**

2-DE - **“Two dimensional electrophoresis”- Eletroforese bidimensional**

ANOVA - **Análise de Variância**

APX - **Ascorpato peroxidase**

AsA - **Ácido ascórbico**

BSA - **Bovine serum albumin**

CAT - **Catalase**

Cd - **Cádmio**

CR - *Solanum lycopersicum* cv. Calabash Rouge

cv. - **Cultivar**

DTT - **Dithiothreitol**

ERO - **Espécies reativas de oxigênio**

GPX - **Glutathione peroxidase**

GR - **Glutathione reductase**

GS - **Glutathione synthetase**

GSH - **Glutathione**

GSSG - **Glutathione oxidized**

GST - **Glutathione S-transferase**

H_2O_2 - **Peróxido de hidrogênio**

HSP - **“Heat Shock Proteins”**

IEF - **Focalização isoeletrica**

KCl - **Cloreto de Potássio**

MDA - **Malondialdeído**

Met - **Metionina**

MetSO - **Sulfóxido de metionina**

MF - **Massa fresca**

Milli-Q - **Água destilada deionizada e filtrada a 0,2 μm**

MS - **Espectrometria de Massas**

MT - *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom

NaClO - **Hipoclorito de sódio**

$\text{O}_2^{\bullet-}$ - **Radical superóxido**

OH[•] - Radical hidroxila

PC - Fitoquelatina

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil

PR - *Solanum lycopersicum* cv. Pusa Ruby

PVPP - Polivinilpolipirrolidona

RNA_m - RNA mensageiro

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - “Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”

SOD - Superóxido dismutase

T₀ -Tempo zero

TBA - Ácido 2-tiobarbitúrico

TCA - Ácido trifluoroacético

TPR - “Tetratricopeptide repeat”

TRF - Tampão de reidratação da fita

TS - Tampão de solubilização

V - Volt

β-ME - Beta-mercaptoetanol

γ-ECS - γ-glutamilcisteína sintetase

1 INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental por metais pesados tem aumentado progressivamente desde a revolução industrial, no século XIX, sendo que algumas atividades como a queima de combustíveis fósseis, a mineração e fundição de minérios metálicos e o uso de fertilizantes contribuem bastante para esse cenário (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010). A presença de metais no solo como cádmio, cromo, mercúrio, cobre e chumbo é mais frequente em áreas populosas e industrializadas, fenômeno ocasionado por ações antropogênicas que aumentam a concentração e disponibilidade desses elementos, que são naturalmente encontrados em formações rochosas em forma dispersa (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010).

O contínuo aumento da população humana e da degradação de ambientes naturais são considerados os principais causadores do crescente índice de doenças, de maneira que a contaminação dos solos, ar e recursos hídricos está diretamente relacionada com 40% das mortes em seres humanos (GLICK, 2010), sendo a contaminação ambiental por metais pesados considerada, a pelo menos 20 anos, como “uma silenciosa epidemia de envenenamento ambiental” (NRIAGU, 1988; ALLOWAY, 1995).

O cádmio (Cd) está entre os elementos não essenciais, que normalmente é encontrado na natureza em baixas concentrações, sendo altamente tóxico mesmo em pequenas concentrações para microrganismos, vegetais e animais (GOMES-JUNIOR et al., 2006; LAMEGO; VIDAL, 2007). As plantas são as principais vias de entrada do Cd na cadeia alimentar, e o acúmulo desse metal em determinados tecidos vegetais pode levar a rejeição comercial de cultivares, diminuição da produtividade, além de ser perigoso à saúde humana (SINGH et al., 2010).

Um dos fatores que influenciam na disponibilidade de metais pesados para os vegetais é a condição do ambiente e a interação da comunidade local. A captação desses metais pelas plantas ocorre preferencialmente quando o ambiente proporciona um alto potencial redox, conforme a ocorrência da elevação do pH a disponibilidade desses e de outros elementos comuns essenciais é afetada (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010).

Apesar das plantas não possuírem um sistema próprio de absorção para o cádmio, este pode ser facilmente absorvido pelos transportadores de cátions, pois possui grande semelhança química com outros elementos essenciais à planta como Zn^{2+} , Ca^{2+} e Fe^{2+} , os quais apresentam ampla especificidade de substrato, sendo então o Cd acumulado principalmente no tecido radicular (GRATÃO et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2008).

Uma vez o metal absorvido pela planta, se iniciam alterações metabólicas em resposta à presença do Cd. Quando expostas a estresses bióticos e abióticos, as plantas podem gerar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), maior do que sua capacidade antioxidante celular pode combater, ocasionando desequilíbrio redox e caracterizando o estresse oxidativo (PANDHAIR; SEKHON, 2006). A indução de ERO, como radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($OH^{\bullet}$) e oxigênio “singlet” (1O_2), ativam a via de defesa antioxidante, composto por numerosos mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos que atuam na proteção de danos oxidativos celulares (GRATÃO et al., 2012).

A linha de defesa antioxidante enzimática é composta principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPX), entre outras, bem como por compostos não enzimáticos que, direta ou indiretamente inativam as ERO, e. g., glutathione (GSH), fitoquelatina (PC), ácido ascórbico (AsA), prolina e carotenóides (GRATÃO et al., 2012).

Outras várias repostas ao estresse são moduladas pelas alterações na expressão dos genes, que se manifestam em nível de RNA ou de proteína. Porém, apesar da transcriptômica investigar os inúmeros transcritos formados em resposta a determinado estímulo, a fim de relacioná-los com os respectivos genes que os codificam, é amplamente reconhecido que a análise do RNA mensageiro (RNAm) é limitada, trazendo pouca informação sobre as mudanças no perfil protéico celular, já que essas são derivadas, muitas vezes, de mudanças traducionais e pós-traducionais (COX; MANN, 2007).

Uma predição mais assertiva sobre o gene pode ser alcançada por meio da análise da expressão de proteínas, principalmente quando a espécie em questão possui o genoma já sequenciado (AGRAWAL et al., 2012). O estudo em nível de proteína madura permite ampla percepção sobre as interações funcionais entre as proteínas. Assim, análises como a eletroforese bidimensional (2-DE) permitem entender melhor as respostas celulares das plantas ao estresse ocasionado por metais pesados, tais como o funcionamento das vias de desintoxicação, translocação, exclusão e transformação desses metais. (AHSAN; RENAUT; KOMATSU, 2009).

Este conhecimento abre inúmeras possibilidades, sendo uma delas o desenvolvimento de plantas transgênicas mais tolerantes e/ou acumuladoras de altas quantidades de metal para uso em processos de fitorremediação. Outra estratégia é o desenvolvimento de plantas que tenham capacidade de desintoxicar o metal, fazendo com que desta maneira, o produto final

não seja contaminado pelo metal e chegue à mesa do consumidor com riscos minimizados a saúde (AHSAN; RENAUT; KOMATSU, 2009).

Tendo esta importante temática em vista, o objetivo do presente trabalho foi estudar o mecanismo de tolerância/sensibilidade de duas cultivares de tomateiro ao metal pesado cádmio, através de análises morfológicas e bioquímicas, sendo complementadas pela caracterização proteica baseada em 2-DE. Além disso, coube ao trabalho identificar e otimizar um método de extração proteica para 2-DE para tecidos de folha e raiz de tomateiro.

Vale ressaltar que esse trabalho, além dos aspectos teóricos, teve também interesse prático direto, sendo o tomateiro considerado como uma planta modelo além de ser um dos vegetais mais consumidos no mundo, contribuindo para os avanços no campo e indústria alimentícia, ao possibilitar, por exemplo, uma seleção de um possível porta-enxerto natural resistente a metais pesados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Metais pesados e sua relação com as plantas

O termo “metal pesado” é usado para designar um grupo heterogêneo de elementos metálicos de alta densidade (maior que 4 g/cm^3), encontrados em sistemas naturais em baixas concentrações, e geralmente associados com poluição ambiental e toxicidade. Dentre estes Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo Ni, Pb, Se e Zn (MALAVOLTA, 1994; MELO et al., 1997).

A toxicidade dos metais pesados para os vegetais é relativa conforme o metal, concentração disponível, especificidade, forma química, composição e pH do solo e espécie da planta, pois muitos desses metais são considerados micronutrientes, sendo essenciais ao desenvolvimento e metabolismo vegetal, como o Cu, Fe e Zn, que servem de cofatores enzimáticos ou estão presentes em metaloproteínas (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010). As metaloproteínas são proteínas que possuem sítios para ligação de metais e que podem ter sua função inibida quando ocorre a substituição do seu cofator por outro metal pesado, resultando na perda da função fisiológica da enzima e alteração do metabolismo vital da planta (KOSOVÁ et al., 2011).

Existem várias fontes que auxiliam a contaminação do solo por metais pesados, entre elas estão os resíduos industriais (principalmente por deposição atmosférica), mineração, fertilizantes inorgânicos, pesticidas, produtos da queima de combustíveis fósseis e lodo de esgoto (NICHOLSON et al., 2003; NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010). Os metais pesados liberados no ambiente terrestre tendem a se concentrar especialmente no solo e sedimentos, que passam a se tornar um grande reservatório disponível para as raízes das plantas, as quais são vulneráveis a variações na concentração destes elementos (LUX et al., 2011).

Estes elementos contaminantes permanecem por um longo período de tempo no ambiente, ocasionalmente tendem ao acúmulo moroso, pois não degradam e dificilmente são metabolizados através dos seres vivos. Desse modo, os metais pesados acumulados podem proporcionar riscos ao equilíbrio da comunidade ecológica, uma vez que podem entrar na cadeia alimentar pelo consumo de plantas acumuladoras (NICHOLSON et al., 2003; AZEVEDO et al., 2012).

Não existe linearidade entre a capacidade de absorção da planta e o aumento da disponibilidade de metais pesados no meio, esse fenômeno apresenta inúmeras variáveis, tais como temperatura, aeração, composição e umidade do solo, competição entre plantas, comunidade microbiana local, assim como características peculiares de cada planta, como sua

taxa de crescimento, sistema radicular e tipo de folhas, e também varia de acordo com as propriedades de cada elemento (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010).

2.2 Toxicidade do Cd em vegetais

O Cd é adicionado ao solo por ações antropogênicas como mineração, utilização de combustíveis fósseis, produção de pigmentos, montagem e descarte indevido de baterias, uso de fertilizantes e fungicidas, bem como adubação com lodo de esgoto e indústrias de galvanoplastias (KIRKHAM, 2006; GUIMARÃES et al., 2008).

O aumento da disponibilidade de Cd no solo também ocorre por meio de fontes naturais, como pela ação do intemperismo em rochas que possuem altas concentrações desse metal como xisto, calcário e arenito, ou no afloramento de materiais geológicos oriundos de plantas (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010).

Em contraste com outros metais, o pH do solo ou da solução não necessita estar baixo para que ocorra a liberação do Cd oriundo dos resíduos de minas ou outras fontes, basta um pH neutro, entre 6-7, para que ocorra a lixiviação e decorrente contaminação de outros ambientes, como leito de rios e solos agrícolas (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010). Entretanto, a absorção de Cd contido no solo pelas plantas é otimizada na presença de pH baixo e exsudados radiculares, estando diretamente relacionada com a transpiração (LUX et al., 2011).

As plantas, no entanto, não possuem um sistema específico para absorção de Cd, sendo esse captado por vias de entrada de elementos essenciais a nutrição da planta pela semelhança de suas características físicas (AHSAN; RENAUT; KOMATSU, 2009), visto que o Cd^{2+} faz parte da classe B dos metais e possui facilidade para se relacionar com ligantes de sulfeto, interagindo com proteínas ricas em cisteína, além de interferir na homeostase desses micronutrientes metálicos (VILLIERS et al., 2011).

Uma estratégia adotada pelas plantas para minimizar o efeito tóxico da presença do Cd é evitar que ele chegue ao xilema, evitando que ocorra o acúmulo do metal na parte aérea, o que pode realizar-se através de síntese de quelantes ou barreiras físicas que impeçam o movimento do Cd através da via apoplástica (LUX et al., 2011).

As plantas tolerantes ao Cd podem se resguardar de seu efeito tóxico excluindo o metal pela raiz, quelando e tornando o Cd um composto não tóxico, ou pela sua deposição em um compartimento celular não vital (LUX et al., 2011; ZHU et al., 2011). Desse modo, plantas que conseguem armazenar grandes quantidades de Cd nos tecidos são utilizadas na

fitorremediação ou fitoextração, removendo esse metal do solo, e. g., *Thlaspi praecox* (VOGEL-MIKUS et al., 2006) e *Solanum nigrum* (GAO et al., 2010).

A tolerância das plantas a toxicidade do Cd também está relacionada à síntese de glutathiona (GSH) e ativação adicional de vias que consomem enxofre no tecido radicular. Outro composto, derivado da GSH, que desenvolve papel de grande importância na tolerância ao Cd é a fitoquelatina (PC), um composto não enzimático formado por peptídeos ricos em cisteína, que possuem função quelante. Estudos mostram que a indução do aumento de síntese de fitoquelatinas, por superexpressão da enzima responsável pelo seu catabolismo final ou por fosforilação de proteínas, pode aumentar a tolerância ao estresse pelo Cd e também sua absorção pela planta (AZEVEDO et al., 2012).

Além das PCs, outro mecanismo de defesa desenvolvido pelas plantas para tolerância à exposição aos metais pesados é a indução de um sistema oxidante de defesa, que é composto por um conjunto de enzimas antioxidantes capaz de remover, neutralizar ou limpar as ERO (SCANDALIOS, 2005). A produção de ERO em baixas concentrações é uma consequência natural do metabolismo celular aeróbio e nestas condições, o metabolismo antioxidante celular promove a anulação destes radicais, não ocasionando danos às células. Porém, sob estresse, o transporte de elétrons principalmente dos cloroplastos e mitocôndrias sofre alterações, desencadeando a produção excessiva das ERO e o desequilíbrio do estado redox das células, caracterizando o estresse oxidativo (MALLICK; MOHN, 2000).

A enzima superóxido dismutase (SOD EC 1.15.1.1) é considerada como a primeira linha de defesa celular contra as ERO, ao dismutar o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). Em seguida, o H_2O_2 é decomposto a H_2O pela ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e/ou glutathiona peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9). Além disso, para a desintoxicação de H_2O_2 , fitofenólicos podem agir como antioxidantes pela doação de elétrons para as peroxidases dependentes de guaiacol (GPOX, EC 1.11.1.7) (GRATÃO et al., 2012).

Vários trabalhos relatam expressão diferencial dessas enzimas na resposta ao estresse por Cd, e é destacada a importância da GSH e a regulação positiva das proteínas envolvidas na sua via de biossíntese, como a glutathiona redutase (GR, EC 1.6.4.2), glutathiona sintetase (GS, EC 6.3.2.3) e glutathiona S-transferase (GST, EC 2.5.1.18), (LEE et al., 2010; VILLIERS et al., 2011). A glutathiona oxidada (GSSG) é reduzida (GSH) através da ação da GR usando NAD(P)H como agente redutor. Todos estes compostos antioxidantes interagem, formando um sistema de resposta antioxidativa dinâmico, que pode minimizar as consequências do estresse e manter o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante (MARTINS et al., 2011).

A enzima GS participa na fixação do nitrogênio e tem sua atividade inibida na presença de altas concentrações de Cd, produzindo efeito tóxico a planta por deixar íons de amônia livre no tecido radicular. Portanto fica claro a participação essencial da GSH e de outros compostos relacionados no controle de desequilíbrios causados pela exposição ao Cd (CARUSO et al., 2009 ; KOSOVÁ et al., 2011). Desse modo, percebe-se que a produção de proteínas ligadas ao sistema antioxidante está diretamente relacionada à resposta ao estresse por Cd, assim como outras proteínas de proteção como as chaperonas (por exemplo, AtCCH, HSP70 e HSP60), enzimas glicolíticas, e tantas outras que tem sua regulação alterada na exposição de plantas a estresse por esse metal pesado (VILLIERS et al., 2011), que representam apenas alguns dos avanços obtidos da junção de análises bioquímicas e fisiológicas com os conhecimentos resultantes da análise do proteoma, demonstrando que esse é um vasto campo ainda a ser explorado, principalmente no que diz respeito a plantas cultivadas.

2.3 Estudo proteômico da resposta ao estresse

Em 2001, Hajduch et al. descreveram pela primeira vez as consequências ocasionadas em plantas por estresse por Cd, através de análise proteômica; desde então, vários trabalhos estudaram os eventos que ocorrem na planta durante a exposição a esse estresse, complementando as análises de transcritos e metabólitos (ROSSIGNOL et al., 2006; BAGINSKY, 2009).

A maioria dos estudos analisando os efeitos de metais pesados através da técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) foram realizadas em arroz (32%) e arabidopsis (16%), plantas modelo de mono e dicotiledôneas. Portanto, ainda existe um grande universo a ser explorado, principalmente estudos que busquem compreender a resposta ao estresse de plantas cultivadas e de interesse comercial, como o tomateiro (AHSAN; RENAUT; KOMATSU, 2009; AGRAWAL et al., 2012).

A capacidade das plantas responderem positivamente a estresses abióticos está diretamente relacionada à produtividade da lavoura, já que o desenvolvimento da planta pode ser afetado, causando na maioria das vezes prejuízos a economia agrícola (ROSSIGNOL et al., 2006). Para evitar perdas na produção são utilizadas técnicas como a aclimação, que ocasiona profundas alterações na expressão gênica, resultando em transcritos, proteínas e metabólitos diferenciais, na tentativa da planta suportar e sobreviver aos diferentes estresses bióticos e abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Estudos com enfoque proteômico trazem respostas mais diretas do que está ocorrendo metabolicamente na planta, já que nem sempre as alterações no nível transcricional correspondem às alterações na expressão de proteínas (GYGI et al., 1999; COX; MANN, 2007). Além disso, as modulações das proteínas acarretam em mudanças na morfologia da célula, no citoplasma, na membrana plasmática e no citoesqueleto, respondendo a aclimação do estresse (LARCHER, 2003).

O estudo proteômico focado na resposta ao estresse pode trazer grandes avanços no melhoramento de plantas cultivadas, pois pode auxiliar no entendimento de mecanismos fisiológicos e bioquímicos relacionados ao estresse, além de possibilitar a identificação de marcadores proteicos, já que alterações na abundância proteica podem estar relacionadas com mudanças quantitativas em alguns parâmetros fisiológicos usados para descrição do nível de tolerância ao estresse de genótipos (KOSOVÁ et al., 2011).

A resposta ao estresse depende da intensidade e duração do mesmo. Inicialmente, ao expor uma planta não aclimatada a situação de estresse essa sofre um choque, no qual ocorre queda do nível de tolerância. Depois, gradativamente, o nível de tolerância torna a aumentar na chamada fase de aclimação, até que se estabeleça uma nova homeostase do metabolismo, a qual será mantida estável na fase de manutenção. Porém, se a planta não obtiver sucesso na manutenção da homeostase induzida pelo estresse ou este for imposto por tempo demasiado, então se inicia a fase de exaustão, na qual ocorre uma nova queda do nível de tolerância (LARCHER, 2003).

Cada estágio do estresse, pelo qual a planta passa, pode ser reconhecido pela modulação de um grupo de proteínas típicas. Na fase de alarme (fase inicial do estresse) pode ser reconhecida pelo aumento e ativação de vias sinalizadoras do estresse e também pela presença de ERO. Na fase de aclimação estão envolvidas várias proteínas reguladoras de ERO e de proteínas protetoras como chaperonas e PCs, assim como outros antioxidantes e osmoprotetores. Já na fase de recuperação essas proteínas protetoras são degradadas e proteínas relacionadas à homeostase são sintetizadas (KOSOVÁ et al., 2011).

O aumento da produção de ERO está ligado ao estresse ocasionado pelo Cd, bem como o consequente aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante. As ERO também podem provocar alterações diretas no proteoma ao gerar oxidação de esqueletos das proteínas e de resíduos de aminoácidos de cadeia lateral. Os resíduos sulfurados são mais facilmente afetados por danos oxidativos, pois possuem alta reatividade com as ERO, e. g., a metionina (Met) pode sofrer oxidação a sulfóxido de metionina (MetSO) (VILLIERS et al., 2011). Um estudo proteômico com *Brassica juncea* submetida na presença de Cd relatou a

expressão de MetSO redutase, uma enzima que regenera Met a partir de MetSO, com o auxílio dos doadores de elétrons glutaredoxina ou tioredoxina (ALVAREZ et al., 2009).

Além dessas alterações nos resíduos contendo enxofre, como ocorre com a metionina, a modificação pós-traducional mais frequente, decorrente da presença acentuada de ERO, é a carbonilação de proteínas, uma reação oxidativa aparentemente irreversível, sendo as proteínas oxidadas degradadas no proteossoma (MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007; VILLIERS et al., 2011). Vários trabalhos que analisaram proteomas de plantas tratadas com Cd relataram a indução de proteínas ligadas à proteólise, como as subunidades de 20S e 26S dos proteossomas, proteínas da família ubiquitina ou outras peptidases. Esse conjunto de informações sobre a degradação de proteínas oxidadas pela via proteossoma, levaram a Villiers et al. (2011) sugerirem que este é um fator importante na tolerância ao metal pesado Cd.

Além disso, o estágio de desenvolvimento também interfere na modulação proteica. Ahsan et al. (2007a) observaram o perfil protéico da raiz de arroz germinado na presença e ausência de Cd por quatro dias, e constataram que ambos os perfis possuíam as mesmas proteínas, mas que algumas delas tiveram sua abundância aumentada na presença do Cd. Algumas dessas proteínas diferencialmente expressas foram identificadas como pertencentes a grupos funcionais de defesa, reparo, desintoxicação e antioxidante, que supostamente, ao trabalharem juntas, permitem que ocorra nova homeostase celular em resposta ao estresse ocasionado por Cd ou outros metais pesados.

A clorose foliar é descrita na literatura como um sintoma comum relacionado ao estresse por Cd e outros metais pesados (PILON-SMITS et al., 2000; HAJDUCH et al., 2001; SANJAYA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2011; PIOTTO, 2012), assim como inibições de proteínas que participam dos processos de fixação de carbono e fotossíntese foram relatados em análise proteômicas de diferentes espécies (como por exemplo, as subunidades maiores e menores da RuBisCO, RuBisCO ativase, Chaperona de Cobre – CCH e fosfoglicomutase), o que pode auxiliar no entendimento da exibição desse sintoma morfológico (AHSAN et al., 2009; SEMANE et al., 2010; VILLIERS, et al. 2011).

Como exposto anteriormente, para que a planta se aclimate ao estresse causado por fatores abióticos é exigido um elevado consumo de energia, e para tanto as proteínas do metabolismo energético são essenciais. Aina et al. (2007), Ahsan et al. (2007a) e Lee et al. (2010) observaram em seus trabalhos, grande abundância de proteínas relacionadas ao metabolismo energético em raiz de arroz exposta ao Cd, tais como, próton-ATPase da membrana do vacúolo, ATP-sintase subunidade catalítica da membrana do vacúolo, ATP

sintase F₀ subunidade 1, ATPase subunidade β , entre outras. Além disso, a presença dessas enzimas ligadas ao vacúolo, corroboram com o importante papel desempenhado por essa organela na tolerância à metais pesados, podendo o Cd ser transportado para dentro do vacúolo quando associados à compostos tióis, como por exemplo, GHS ou PCs (LEE et al., 2010).

Villiers et al. (2011) propuseram que o aumento das enzimas biossintéticas está relacionado a maior requisição de produção de ATP, NADH e NADPH, para suprir a demanda energética das células, mas como também manter as moléculas de poder redutor e produzir esqueletos de carbono (fosfoglicerato, α -cetoglutarato) necessários para a síntese de aminoácidos e moléculas envolvidas na quelação do Cd.

Essas e muitas outras proteínas foram e ainda podem ser identificadas e relacionadas a tolerância e sensibilidade de plantas ao estresse por Cd e outros metais pesados, através de estudos que abordam a comparação de alterações no proteoma de espécies relacionadas, revelando respostas contrastantes as condições estabelecidas. Essas revelações proteômicas podem influenciar na confecção de novos biomarcadores de tolerância, através de análise de conjuntos de genótipos satisfatoriamente grandes, permitindo encontrar alelos específicos correspondentes às proteínas individuais que podem ser correlacionados a uma variação fisiológica. Assim esses dados podem ser utilizados por programas de melhoramento de plantas que visam o aumento da tolerância ao estresse (KOSOVÁ et al., 2011).

2.3.1 Análise proteômica em Eletroforese Bidimensional (2-DE)

Em 1975, O'Farrell modificou a análise de produtos gênicos, introduzindo agentes caotrópicos e detergentes na solubilização de proteínas e na separação em duas dimensões, implementando a técnica que atualmente é chamada de eletroforese bidimensional (2-DE). Desde então a técnica tem sido aprimorada na busca de entender melhor a funcionalidade dos genes observando a modulação de proteínas (GÖRG et al., 2009).

Para o sucesso na utilização de 2-DE, é necessário conhecer as características do material vegetal a ser analisado, para que técnica de extração utilizada seja a mais adequada e permita a melhor resolução no gel, evitando listras, arrastes e manchas que possam interferir na qualidade e análise dos géis. Dessa forma, todo cuidado deve ser tomado no preparo das amostras, para que ao final se obtenha padronização das proteínas e reprodutibilidade dos géis (THIELLEMENT et al., 2007; ASHAN et al., 2009).

Muitas vezes os tecidos vegetais possuem interferentes, como compostos fenólicos, proteases, pigmentos, polissacarídeos, lipídeos, ácidos nucleicos e outros metabólitos

secundários, que geram efeitos negativos sobre a análise, mas que podem ser minimizados com a escolha de um método de extração eficiente (SARAVANAN; ROSE, 2004; THIELLEMENT et al., 2007).

Entre as técnicas mais citadas para extração de proteínas de tecidos submetidos a estresse por metal estão a de TCA/Acetona e Fenol, sendo ambos considerados eficientes na remoção de contaminantes e de fácil processamento, porém outras técnicas de extração também são utilizadas, como a extração em tampão Tris. Na busca do aperfeiçoamento e otimização da técnica e melhor resolução das proteínas no gel, conjunções dessas técnicas são utilizadas, como a extração com Fenol ou Tris e precipitação com TCA/Acetona (XU; XU; HUANG, 2008; ASHAN et al., 2009).

Normalmente as análises de expressão diferencial proteômica do estresse são realizadas através de comparações de composição de proteomas diferenciais, que podem ser obtidos de plantas não estressadas e de plantas sob estresse ou ainda de plantas que possuem diferentes níveis de tolerância ao estresse, utilizando da técnica de 2-DE e posteriormente a identificação e quantificação das proteínas de interesse pode ser feita por análise em espectrometria de massas (MS) (ROSSIGNOL et al, 2006; KOSOVÁ et al., 2011).

Apesar da técnica 2-DE já ter passado por aprimoramentos, sabe-se que é uma técnica restrita, pois em um único gel não é possível a visualização de todas as proteínas expressas, principalmente as de menor expressão, em um determinado tecido de organismos complexos, e nem é possível a identificação da localização subcelular a partir de extrato de mistura complexa de proteínas. Também há restrições segundo o tamanho das proteínas, não sendo visualizadas no gel proteínas menores que 8 KDa e maiores que 200 KDa, assim como necessita-se de métodos específicos de preparação de amostra para proteínas altamente hidrofóbicas ou alcalinas, pois pelos métodos de extrações usuais a maior gama das proteínas solúveis possui ponto isoelétrico (pI) na faixa de pH 4-8 (HARRY et al., 2000; ROSSIGNOL et al., 2006).

Mesmo com tais dificuldades, a técnica permite separar com precisão proteínas distintas em apenas um aminoácido, sendo um gel 2-DE capaz de separar mais de mil spots. Além disso, para as proteínas facilmente solubilizáveis a correlação com os níveis detectáveis de RNAm é relativamente boa, como pode ser determinado por microarranjo ou PCR em tempo real, entre outras técnicas (HARRY et al. 2000; ROSSIGNOL et al., 2006), demonstrando ser possível elaborar o mapa global, ou perfil, de muitos produtos gênicos contidos na célula no instante analisado.

2.4 Tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) como modelo de estudo

Espécie de grande importância agrícola, o tomateiro se destaca como um dos vegetais mais produzidos no mundo. O Brasil detém a nona maior parcela da produção mundial, sendo a cultura do tomateiro a quinta maior do país, que atingiu 4.146.466 toneladas na safra de 2011 (IBGE, 2011; FAO, 2013).

Além de sua importância nutricional e econômica, o tomateiro é considerado um excelente modelo para estudos de genômica funcional de plantas frutíferas (SABLOK et al., 2013), e devido sua grande quantidade de tecidos (raiz, folha, caule, fruto e semente) facilita a condução de análises bioquímicas, apresentando padrão morfológico diferente do modelo mais comumente utilizado, a *Arabidopsis* (LIMA et al., 2004; PINO et al., 2010).

A variedade Micro-Tom (MT) é comparável à *A. thaliana*, sendo utilizada como modelo científico, devido a uma mutação no tomateiro que lhe conferiu porte pequeno (15-20 cm de altura) e ciclo de vida curto (70-90 dias), o que proporciona economia de espaço experimental e estudo de todos os tecidos, incluindo os frutos (WATANABE et al., 2007). Porém ao se utilizar o MT não é possível explorar a variabilidade genética contida na espécie, que já é restrita devido ao processo de domesticação (VEASEY et al., 2011).

Recentemente o genoma do tomateiro foi decodificado em 35 mil genes, através da *Solanum lycopersicum* cv. Heinz 1706, que possibilitará ampliar o conhecimento sobre a relação dos genes e as qualidades requeridas pelos produtores, como sabor do fruto, valor nutricional, resistências a estresse biótico e tolerância a estresse abiótico (The Tomato Genome Consortium, 2012).

Apesar da comparação dos genomas do tomateiro domesticado, citado acima, com o seu parente próximo *Solanum pimpinellifolium*, uma espécie selvagem originária da América do Sul, detectar apenas 0,6% de divergência entre a composição de seus DNAs, foi encontrado 39% de regiões codificadoras de proteínas compartilhadas que perderam ou ganharam códons de parada, condição que é altamente suscetível a afetar a formação e função de proteínas. Essas alterações podem ter sido decorrentes do processo de domesticação ou inerentes às propriedades únicas da estrutura do genoma do tomateiro (The Tomato Genome Consortium, 2012), cabendo a estudos futuros tentarem responder essa pergunta, sendo a técnica proteômica de grande valia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Foram utilizadas duas cultivares de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.): cv. Calabash Rouge (CR) (origem: México) e cv. Pusa Ruby (PR) (origem: Índia). Estas cultivares foram pré-selecionadas pelo nosso grupo de estudos em experimentos anteriores (PIOTTO, 2012), sendo consideradas como sensível e tolerante ao metal Cádmio, respectivamente.

3.2 Modelo experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Departamento de Genética da ESALQ/USP-Piracicaba. As sementes das cultivares foram previamente tratadas com 50% de hipoclorito de sódio (NaClO) por 15 min, e colocadas para germinar em bandejas plásticas de mudas com vermiculita (Figura 1), sendo irrigadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) a 10% de força iônica, modificada para tomateiros como descrito por Pino-Nunes (2005), e mantidas em casa de vegetação. Após 20 dias da semeadura, as plantas foram transferidas para sistema de hidroponia.

O sistema hidropônico foi montado com bandejas plásticas de dimensões de 550x350x80 mm (comprimento x largura x altura), forradas com sacos de plástico preto. Para dar suporte para as plantas foram utilizadas placas de isopor de tamanho 500x330x20 mm (comprimento x largura x altura) com espaçamento de 80 mm entre os orifícios, onde as plantas foram fixadas com o auxílio de espuma acrílica. Cada bandeja foi considerada como sendo um módulo experimental (Figura 1).

Figura 1 – Instalação do experimento em casa de vegetação. (A) Germinação das sementes das cultivares em bandeja plástica de mudas com vermiculita. (B) Sistema de hidroponia utilizado no experimento, composto por bandejas plásticas forradas com sacos plásticos, tubos de ar com pedra porosa de aquário para aeração e homogeneização da solução nutritiva. (C) Plantas de tomateiro com 20 dias, transplantadas para hidroponia e fixadas com espuma acrílica em placas de isopor furadas. (D) Visão geral do sistema de hidroponia montado para o experimento

Depois de vários experimentos preliminares (PIOTTO, 2012) e revisão de literatura (DONG; WU; ZHANG, 2006; LÓPEZ-MILLÁN et al., 2009; MANAA et al., 2011), observou-se que para o cultivo de tomateiro em hidroponia é necessário adaptação das plantas à solução nutritiva, cultivando-as primeiramente em vermiculita e adubando-as com solução de Hoagland e Arnon a 10% de força iônica, após a germinação. Depois de 20 dias, as mudas de tomateiro foram transplantadas para hidroponia em solução Hoagland e Arnon a 10% de força iônica (pH 6,0) aumentando-se a concentração de sais gradualmente durante cinco dias, até atingir 25% de força iônica. Desta maneira as plantas não sofreram estresse causado pela concentração de sais, e estavam no estado de crescimento ótimo para adição do metal ao meio.

3.3 Delineamento experimental e tratamentos

Os tratamentos foram compostos de duas cultivares de tomateiro (CR e PR) e duas concentrações de cádmio (0 e 50 μM de CdCl_2), em esquema fatorial 2x2 inteiramente ao acaso. Foram usadas três repetições compostas por parcelas de seis plantas (Figura 2) para as análises bioquímicas e três repetições compostas por parcelas de duas plantas para efetuar os cálculos de taxa de crescimento relativo, massa seca, quantificação de Cd e Índice de Tolerância. A composição das parcelas foi feita conforme sorteio de duas plantas por submódulo. Foram consideradas duas coletas, sendo a primeira delas realizada no momento da aplicação do metal (tempo zero - T0) e a segunda quatro dias depois da aplicação deste, na qual foram coletadas as plantas controle (concentração 0 μM de CdCl_2) e as plantas sob estresse pelo Cd (50 μM de CdCl_2).

Figura 2 – Modelo experimental em módulos de crescimento com 24 plantas divididas em 4 submódulos de 6 plantas de cada cultivar

Plantas de tomateiro de 20 dias, após passarem por cinco dias de adaptação à solução nutritiva (25 dias de idade) foram expostas ao Cd por quatro dias, sendo então coletadas as amostras para as análises aqui apresentadas. O estágio de desenvolvimento e o tempo de exposição ao metal foram determinados em trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa.

As amostras de folha e raiz coletadas para análises bioquímicas foram imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o

processamento. As amostras para a determinação de massa seca e quantificação de metal foram acondicionadas em sacos de papel e mantidas em estufa (60 °C) para secagem até massa constante. O Índice de Tolerância foi estimado conforme proposto por Piotto (2012):

$$IT = \frac{(ms_{f_i \text{ Cádmió}} - ms_o)}{(ms_{f \text{ Controle}} - ms_o)}$$

Onde:

IT = Índice de Tolerância

$ms_{f_i \text{ Cádmió}}$ = Massa seca final da i -ésima planta exposta ao Cd

$ms_{f \text{ Controle}}$ = Massa seca média final das plantas controle

ms_o = Massa seca média inicial das plantas

3.4 Massa seca e quantificação de Cd

Para a análise de massa seca, as plantas coletadas conforme descrito no item 3.3, foram cuidadosamente lavadas em água corrente e acondicionadas em sacos de papel, sendo desidratadas a 60 °C em estufa até massa constante.

Depois de completamente desidratada cada planta foi pesada para avaliação da massa seca total, e posteriormente dividida em parte aérea e radicular, pensando-se cada parte separadamente. Para quantificação de Cd nos tecidos, cada planta foi decomposta em folhas, caule e raiz.

A quantificação de Cd nos tecidos vegetais foi realizada por meio de digestão nitro-perclórica (MALAVOLTA et al, 1997), em que 250 mg de tecido seco, macerado até a textura de pó fino, foi posto em tubo de ensaio e acrescido de 2,5 mL de ácido nítrico e de 0,25 mL ácido perclórico. A mistura permaneceu por aproximadamente por 14 horas em bloco digestor sob temperatura ambiente. Após esse período a temperatura foi elevada 50 °C a cada 30 minutos até atingir a temperatura de 300 °C, e o processo prosseguiu até a total evaporação dos reagentes no tubo. Para proceder com as leituras das amostras, em espectroscopia de emissão ótica de plasma acoplado (ICP-OES), acrescentou-se 25 mL de água ultrapura. Tais leituras foram realizadas no Instituto Agrônômico de Campinas – IAC.

3.5 Quantificação de malondialdeído (MDA) resultante da peroxidação lipídica

O dano oxidativo aos lipídeos da membrana celular foi estimado pelo conteúdo de substâncias reativas com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), expresso na forma de malondialdeído (MDA), obtido por espectrofotometria a 535 e 600 nm, adaptado de Heath e Packer (1968).

Os tecidos vegetais frescos foram macerados em ácido trifluoroacético (TCA) 0,1% (m/v) na proporção de 0,1 g mL⁻¹ de tampão para folha e 0,2 g mL⁻¹ para raiz, juntamente com 20% de PVPP (m/v). Após homogeneização, a amostra foi centrifugada a 10000 rpm por 5 min. Do sobrenadante, foi reservado 250 µL e adicionado 1 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5% (m/v). A reação permaneceu por 30 min a 95 °C, e após foi resfriada no gelo por aproximadamente 10 min. Para retirar qualquer resíduo e bolhas que atrapalhassem na leitura, as amostras foram novamente centrifugadas (10 min a 10000 rpm) e em seguida permaneceram em descanso por 5 min antes de ser realizada a leitura em espectrofotômetro. A quantidade de MDA foi expressa em nmol g⁻¹ de massa fresca.

3.6 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O H₂O₂ foi quantificado segundo protocolo de Alexieva et al. (2001). As amostras frescas de folhas e raízes foram maceradas com TCA 0,1% na relação de 100 mg mL⁻¹ (m/v). Após homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugados a 10000 rpm por 15 min, a 4 °C. Foi reservado 200 µL do sobrenadante, ao qual se adicionou 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 µL de iodeto de potássio 1 M. Os tubos com a reação foram colocados no gelo e permaneceram no escuro durante uma hora. Para estabilizar a reação, as amostras permaneceram 20 min no escuro e em temperatura ambiente, sendo posteriormente realizada a leitura em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40 a 390 nm. A quantidade de H₂O₂ foi expressa em µmol g⁻¹ de massa fresca.

3.7 Perfil protéico por eletroforese bidimensional

3.7.1 Métodos de extração de proteínas solúveis totais

Para a extração das proteínas totais foram testados, por nosso grupo de pesquisa, quatro métodos de extração (Tabela 1), para estabelecer o mais adequado para a espécie e tecidos em questão, priorizando o aprimoramento do método e resultados.

Os testes dos tampões de extração foram realizados com a cultivar modelo *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom (MT), para preservar o material definitivo do experimento. Para confiabilidade e padronização dos testes, a extração de proteínas solúveis totais do material

vegetal consistiu em transferir 0,5 g do tecido de folha ou 1,5 g do tecido de raiz diretamente para tubos de centrifuga, previamente macerado com N₂ líquido, e acrescentando imediatamente o tampão de cada extração, conforme a tabela 1.

Tabela 1 – Descrição da composição e proporção dos tampões utilizados para teste de extração de proteínas solúveis de tomateiro, utilizando o modelo *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom

Tampão de Extração	Composição	Proporção
Fenol Amalraj et al. (2010)	Sacarose 0,7 M; Cloreto de Potássio (KCl) 0,1 M; Tris 0,5 M; EDTA 50 mM; PMSF 1 mM; β-mercaptoetanol (β-ME) 2% (v/v); fenol ⁽¹⁾ . pH 7,5	0,5 g de folha ou 1,5 g de raiz em 15 mL de tampão
TCA/Acetona Xu et al. (2008)	Ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v); β-ME 0,07% (v/v) em Acetona P.A.	0,5 g de folha ou 1,5 g de raiz em 10 mL de tampão
Tris-base Xu et al. (2008)	Tris 40 mM; Uréia 5 M; Tiouréia 2 M; CHAPS 2% (m/v); PVP 5% (m/v); β-ME 2% (v/v)	0,5 g de folha ou 1,5 g de raiz em 4 mL de tampão
Tris /TCA Lee et al. (2011)	Tris 100 mM; DTT 5 mM; EDTA 1 mM; PMSF 1 mM; TCA em acetona ⁽²⁾ . pH 8,5	0,5 g de folha ou 1,5 g de raiz em 8 mL de tampão

⁽¹⁾ 15 mL por tubo acrescido somente após 30 min, para que as proteínas solúveis no tampão aquoso migrem para fase fenólica

⁽²⁾ 30 mL por tubo acrescido depois ao sobrenadante, com a função de lavar os resíduos da extração e precipitar as proteínas

A extração realizada utilizando-se o tampão TCA/Acetona apresentou os melhores resultados, sendo mais rentável na extração de proteínas solúveis totais de MT, e obteve maior reprodutibilidade na confecção dos géis, como será exposto mais a frente. Dessa maneira, foi o tampão utilizado para as análises para os materiais vegetais das cultivares Calabash Rouge e Pusa Ruby.

3.7.2 Extração de proteínas solúveis totais por método TCA/Acetona

Para os tecidos vegetais oriundos de CR e PR manteve-se a proporção descrita na tabela 1, deste modo, pesou-se 0,5 g de tecido foliar e 1,5 g de tecido radicular fresco. Previamente maceradas em moinho, com auxílio de N₂ líquido, as amostras foram pesadas diretamente em tubo de centrífuga e prontamente acrescidas de 10 mL de solução de precipitação constituído por TCA 10% (m/v); β -ME 0,07% (v/v) em acetona (P.A.). A mistura nos tubos foi homogeneizada rapidamente no agitador e depois colocada em freezer -20 °C por 2 h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 30 min, a 12000 rpm a 4 °C, sendo o sobrenadante descartado e iniciado o processo de lavagem do *pellet*. Foram realizadas duas lavagens do *pellet* com 10 mL de solução β -ME 0,07% (v/v) em acetona (P.A.), e a cada etapa a mistura ficou em repouso por 2 h a -20 °C; após, foi centrifugada como descrito acima, sendo o sobrenadante descartado cuidadosamente para não desfazer o *pellet*. O tubo com *pellet* obtido foi colocado em dessecador a vácuo a 4 °C durante 2 dias, para completa secagem da amostra.

3.8 Solubilização e determinação da concentração das proteínas solúveis totais

Após completa secagem dos *pellets*, as proteínas foram solubilizadas de acordo com Amalraj *et al.* (2010) em tampão de solubilização (TS) composto por uréia 7 M, tiuréia 2 M, CHAPS 4% (m/v), IPG (*Immobilized pH gradient buffer*) 2% (v/v) e DTT 0,3% (m/v).

O *pellet* foi solubilizado no próprio tubo de centrífuga ao se adicionar 2,5 mL de TS; em seguida a mistura foi homogeneizada através de agitação vigorosa por 3 min e posteriormente colocada em banho ultrassônico com água gelada por 20 min.

As amostras foram centrifugadas por 15 min, 14000 rpm a 4 °C, sendo recuperado o sobrenadante que foi transferido para um microtubo e novamente centrifugado por 10 min, 14000 rpm a 4 °C para separar todos os resíduos da amostra. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, e armazenado em freezer -80 °C até o processamento das amostras.

Uma alíquota de cada amostra foi utilizada para quantificação de proteínas solúveis totais. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando-se o BSA (*bovine serum albumin*) como padrão, e o resultado expresso em mg proteína mL⁻¹ extrato protéico.

3.9 Análise do perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Para a confecção de um mini gel de poliacrilamida a 10% e do tampão corrida da eletroforese foi utilizada a metodologia descrita por Laemmli (1970). A eletroforese foi conduzida a temperatura ambiente em corrente constante de 15 mA gel⁻¹. Para cada gel foi aplicado 3 µL de padrão BenchMark - Protein Ladder – Invitrogen e 30 µg de proteína extraída por canaleta. Os géis foram corados com solução de Coomassie Coloidal, composta por metanol 20%, sulfato de amônio 8%, ácido fosfórico 0,8% e Coomassie Blue G-250 0,08%, durante 12 horas e posteriormente o excesso de corante foi retirado com três lavagens com água Milli-Q, até a perfeita visualização das bandas.

3.10 Análise do perfil protéico em gel por eletroforese bidimensional (2-DE)

Todas as condições abaixo descritas foram testadas anteriormente com o material vegetal MT, e após criteriosa avaliação dos resultados com o grupo de pesquisa, foi determinada a metodologia mais adequada para os materiais cv. CR e PR.

3.10.1 Primeira dimensão: Focalização isoeletrica das proteínas

Primeiramente foi testado o protocolo padrão de focalização isoeletrica (IEF) utilizado pelo nosso grupo de pesquisa (Tabela 2), em fitas de 18 cm, constituídas de gel de poliacrilamida desidratado, com gradiente de pH imobilizado de 3-10 não linear (GE Healthcare – Immobiline DryStrip). Foram utilizados 500 µg de proteínas solúveis totais (folha e raiz) do material cv. MT a fim de se conhecer as características básicas do proteoma do tomateiro.

Tabela 2 – Parâmetros de focalização isoeletrica utilizada para os tecidos de folha e raiz de tomateiro cv. MT, utilizando fitas de pH 3-10 não linear no equipamento *Ettan IPGphor3* a 20 °C. Protocolo IEF de acordo com Amalraj et al. (2010), com modificações

Etapas	Voltagem (V)	Duração (horas)
Reidratação	0	4
Step 1	30	12
Step 2	100	1
Step 3	200	1
Step 4	400	1
Step 5	700	1
Step 6	1000	1
Step 7	5000	10
Step 8	8000	4
Step 9	100	3
Total	85000	38

De acordo com esse teste inicial, percebeu-se que os géis obtidos a partir desse protocolo de focalização isoeletrica (IEF) não eram compatíveis com as propriedades das proteínas a serem analisadas, optando-se por testar novo protocolo de IEF (Tabela 3), que mostrou ser altamente eficiente, o que pode ser visualizado na figura 3. A análise preliminar desses géis também possibilitou detectar que o proteoma de tomateiro se concentra na região de pH 4-7, o que fundamentou a mudança de faixa de pH da fita utilizada para o experimento definitivo com o material cv. CR e PR.

Tabela 3 – Ajustes dos parâmetros para o programa de focalização utilizado para os tecidos de folha e raiz de tomateiro cv. CR e PR, utilizando fitas de pH 4-7 não linear no equipamento *Ettan IPGphor3* a 20 °C. Protocolo IEF de acordo com Saravanan e Rose (2004), com modificações

Etapas	Voltagem (V)	Duração (horas)
Reidratação	0	1
Step 1	30	12
Grad 2	150	1
Grad 3	300	1
Grad 4	500	1
Grad 5	3000	2
Grad 6	6000	2
Grad 7	10000	2
Step 8	10000	7
Total	109300	29

Figura 3 – Análise 2-DE do proteoma do tecido foliar (A e B) e do tecido radicular (C e D) de tomateiro cv. MT, extraídos com método TCA/Acetona. As proteínas foram separadas em gradiente não linear de pH 3-10 em primeira dimensão e visualizadas com coloração de Coomassie Coloidal. (A) e (C) foram submetidos ao protocolo de focalização isoeétrica conforme Amalraj et al. (2010). (B) e (D) foram submetidos ao protocolo de focalização isoeétrica conforme Saravanan e Rose (2004)

Baseados nas características observadas nos testes com MT, a IEF foi conduzida de acordo com a tabela 3, para o material cv. CR e PR, no aparelho *Ettan IPGphor3* a 20 °C, utilizando fitas de pH 4-7 (GE Healthcare – Immobiline DryStrip) com 18 cm de extensão. Foram utilizados 500 µg de proteínas solúveis totais para as análises de folha e de 800 µg para as análises de raiz, as quais foram acrescidas de tampão de reidratação da fita (TRF), composto por Uréia 7 M, Tiouréia 2 M, Chaps 4% (m/v), Triton X-100 0,5% (v/v), DTT 50 mM, tampão IPG 2% (v/v) e de Azul de bromofenol 0,5% (v/v), em volume final de 375 µL. Fita e mistura foram devidamente alocadas em suportes de cerâmica (sarcófago) e cobertas por 800 µL de óleo mineral próprio para focalização.

O programa de focalização utilizado foi baseado no trabalho de Saravanan e Rose (2004), sendo realizadas algumas modificações que foram testadas anteriormente com o material vegetal MT (Tabela 3). Ao termino da IEF, as fitas foram lavadas com água Milli-Q e armazenadas a -80°C.

3.10.2 Segunda dimensão: Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

Após a IEF as fitas foram equilibradas de acordo Amalraj et al. (2010) em: *solução de redução*: (6 mL fita⁻¹): Tris-HCl (pH 8,8) 0,05 M, Uréia 6 M, Glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v) e DTT 1% (m/v) em leve agitação e temperatura ambiente durante 15 min; seguida de *solução de alquilação*: (6 mL fita⁻¹): Tris-HCl (pH 8,8) 0,05 M, Uréia 6 M, Glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v), Iodoacetamida 2,5% (m/v) e azul de bromofenol 0,002% (v/v), em leve agitação e temperatura ambiente durante 15 minutos.

A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida 12,5% (v/v), espessura de 0,75 mm e dimensões 20 x 20 cm. As fitas já equilibradas foram acomodadas horizontalmente na parte superior do gel e depois seladas com solução de agarose 0.5% (m/v). A eletroforese foi conduzida a 4 °C com 15 mA gel⁻¹ durante 30 min, em seguida a corrente elétrica foi aumentada para 30 mA gel⁻¹ durante 7 h, em tampão de corrida de eletroforese (LAEMMLI, 1970).

Após a eletroforese, os géis foram fixados por 1 h em solução composta por etanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) antes de serem corados com Coomassie blue G-250 por 12 horas (CANDIANO et al., 2004) em agitação branda. Para retirar o excesso de coloração dos géis, estes foram submetidos a três lavagens com água Milli-Q, e imediatamente digitalizados. Todos os géis foram armazenados em solução de ácido acético 7% (v/v).

3.10.3 Análise e tratamento das imagens digitalizadas do gel

As imagens dos géis foram digitalizadas com o auxílio do scanner *ImageScanner*, o qual é gerenciado pelo software *LabScan versão 5.0*, ambos da marca *Amersham Biosciences*. As imagens obtidas foram analisadas por meio do software *Image Master 2D Platinum 7* (GE Healthcare).

Todas as imagens foram submetidas, igualmente, a detecção automática de *spots* e aos parâmetros de contraste, suavidade (valor 3), saliência (valor 600) e área mínima (valor 41). Posteriormente, foi realizada triagem manual para confirmação da veracidade dos *spots*, melhorando o alinhamento entre as triplicadas dos géis de mesmo tratamento, para posterior confrontação entre tratamentos:

- CR folha tratamento 0 μM CdCl_2 vs. CR folha tratamento 50 μM CdCl_2
- CR raiz tratamento 0 μM CdCl_2 vs. CR raiz tratamento 50 μM CdCl_2
- PR folha tratamento 0 μM CdCl_2 vs. PR folha tratamento 50 μM CdCl_2
- PR raiz tratamento 0 μM CdCl_2 vs. PR raiz tratamento 50 μM CdCl_2

Os dados resultantes das análises das imagens dos géis foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e cada média da porcentagem de volume (%vol) dos *spots* foi submetida ao teste t de Student para comparação dos *spots* correspondentes entre o material controle e tratado com Cd. Foi considerado significativo quando a variação de médias da %vol dos *spots* obteve $p < 0,05$, já para considerar *spots* exclusivos foi considerado médias da %vol dos *spots* com $p < 0,01$. Entretanto, apenas foram consideradas proteínas diferencialmente expressas aquelas que apresentaram alteração na %vol da razão (tratado com Cd/ controle) acima de 2 (100% de variação para mais em relação ao controle) e abaixo de 0,5 (50% de variação para menos em relação ao controle), de acordo com a literatura (CHENG et al., 2010; BARBOSA et al., 2012).

3.10.4 Armazenamento dos *spots* diferencialmente expressos

Os *spots* estatisticamente diferentes selecionados foram retirados das triplicatas dos géis manualmente e fragmentados em pedaços de aproximadamente 1 mm³, colocados em microtubos e armazenados em solução de ácido acético 5% (v/v) até o processamento para o sequenciamento.

O sequenciamento dos *spots* foi agendado para o mês de junho no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, em Campinas, por isso esse dados não serão apresentados.

3.11 Análises estatísticas

Os dados de massa seca, quantificação de Cd nos tecidos, peroxidação lipídica (MDA), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e quantificação de proteínas, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade e erro. Os parâmetros dos modelos, tais como homogeneidade de variâncias e distribuição normal dos resíduos, foram checados usando o teste de Bartlett (1937) e Shapiro-Wilk (1965). Todas as análises foram realizadas usando o software *R versão 2.15.1*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração de proteínas de tomateiro e resolução em géis 2-DE: teste com a cultivar modelo MT

A etapa de extração de proteínas é um passo crítico na técnica de 2-DE, a qual interfere diretamente na qualidade, quantidade e distribuição padrão das proteínas. Os tecidos vegetais possuem grande quantidade de proteases e metabólitos secundários que interferem seriamente na qualidade da resolução dos géis, sendo necessário sua remoção na etapa inicial do processo para se obter sucesso na análise de 2-DE (AMALRAJ et al., 2010).

Apesar de já existir na literatura descrição de extrações para o proteoma de tomateiro, se fez necessário aperfeiçoar a técnica em relação à quantidade de massa fresca (MF) inicialmente utilizada para extração, associada com o rendimento de proteínas totais extraída (mg gMF^{-1}), concentração do extrato protéico final e reprodutibilidade na resolução dos géis. Para isso foram testados quatro diferentes métodos de extração, baseados nos métodos comumente citados na literatura, buscando determinar o método que apresentasse melhor resolução das proteínas no gel e menos interferentes, assim como maior número e intensidade de *spots*.

A quantidade de matéria fresca dos tecidos é um grande obstáculo na reprodutibilidade da análise proteômica, dessa forma, foi utilizado o mínimo de material vegetal necessário, igual a 0,5 g de folha e 1,5 g de raiz, para todas as extrações testadas. Os protocolos relatados na literatura para o tomateiro se utilizaram de quantidades maiores de MF inicial, a exemplo de Saravanan e Rose (2004), que apresentaram análises comparativas de métodos de extração de proteomas de tomateiro oriundos de folha, caule e raiz, utilizando para todos os testes 5 g de MF, quantia também utilizada para extração do tecido foliar de tomateiro por Isaacson et al. (2006).

A quantificação de proteínas solúveis totais foi relacionada com o volume final e rendimento total do extrato protéico (Tabela 4). Para os extratos obtidos de folha e raiz foram observados maior rendimento protéico total (mg gMF^{-1}) para o método baseado na extração com TCA/Acetona (16,96 Folha; 3,06 Raiz), seguido de Fenol (9,54 Folha; 1,47 Raiz) (Tabela 4). Saravanan e Rose (2004) observaram maior rendimento o método de extração com Fenol em vários tecidos de tomateiro, porém, Xu et al. (2008) também observaram resultados semelhantes ao desse trabalho, em um estudo metodológico para extração de proteínas e resolução em gel bidimensional em gramínea.

Tabela 4 – Média de quantificação de proteínas solúveis totais e rendimento total proteico obtido utilizando diferentes métodos de extração proteica do material vegetal *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom

Métodos	Proteína solúvel total (mg mL ⁻¹)		Volume do extrato protéico (µL)		Rendimento total protéico (mg gMF ⁻¹)	
	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz
Fenol	10,60 ab	4,90 a	450	450	9,54	1,47
TCA/Acetona	4,24 c	1,84 b	2000	2500	16,96	3,06
Tris-base	8,07 b	2,84 b	300	400	4,84	0,76
Tris /TCA	14,24 a	2,73 b	300	300	8,55	0,55

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro

Entretanto, o volume final do extrato protéico também foi considerado; por exemplo, nesse trabalho foi utilizado o volume final de 375 µL para reidratação das fitas utilizadas na IEF. Deste modo, o volume da amostra a ser utilizada depende da concentração de proteínas no extrato protéico, e esse último está relacionado à quantidade de géis que poderão ser confeccionados com o mesmo extrato, aumentando assim a padronização do proteoma visualizado nos géis.

O passo seguinte foi submeter as proteínas solúveis totais à focalização isoeletrica, na qual foram separadas em gradiente não linear de pH 3-10, e posteriormente submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida. Os géis obtidos com esses critérios (Figura 3) possibilitaram observar que a faixa de pH 4-7 apresentou maior distribuição das proteínas do tomateiro, mesma faixa que foi usada nos trabalhos de caracterização de proteoma de tomateiro de Saravanan e Rose (2004) e Sheoran et al. (2007). Dessa forma, estes dados permitiram definir a fita de pH 4-7 a ser utilizada na análise das proteínas de tomateiro, independente do tecido a ser analisado.

Para a análise final do método ideal de extração para proteínas de tomateiro, foram confeccionados géis com resolução em segunda dimensão e corados com Coomassie Blue, técnica compatível com identificação de proteínas por MS, de fácil manuseio e baixo custo (GE Healthcare, 2004). As imagens dos géis (Figura 4) evidenciaram boa padronização das proteínas mais abundantes entre géis resultantes de diferentes extrações.

No entanto, uma detecção visual preliminar permitiu distinguir que o método de Fenol foi menos eficiente que os demais, exibindo diminuta quantia de *spots* comparativamente aos outros métodos de extração (Figura 4). Apesar de a extração fenólica ser bastante utilizada

como metodologia principal em muitos trabalhos de 2-DE de tomateiro, Sheoran et al. (2009) relataram que as etapas de lavagens e resolubilização das amostras influenciam na abundância de *spots*, pois, quanto maior o número de passos existentes no método de extração, maior é a variação na recuperação de proteínas, o que corrobora com o perfil observado para o método de Fenol (Figura 4).

Em seu trabalho Sheoran et al. (2009) também observaram diferenças na abundância de *spots* entre os métodos de extração testados, e constataram que não há uma relação direta da quantidade de *spots* com a abundância de proteínas quantificadas pelo método de Bradford (1976). O valor resultante na quantificação de proteínas totais pode ser alterado pela presença de contaminantes e pequenos peptídeos, que pode ser o caso da técnica de extração Tris-base. Apesar dessa técnica ter apresentado valores compatíveis de proteínas totais solúveis (Tabela 4), a viscosidade do extrato resultante dificultou a aplicação da amostra para isofocalização e os géis não apresentaram resolução de *spots* (dados não apresentados).

As imagens dos géis (Figura 4) permitiram observar padronização da maioria das proteínas extraídas com o método TCA/Acetona ou Tris/TCA, assim como abundância e intensidade dos *spots*, considerados ao final como igualmente eficientes na resolução do proteoma de tomateiro. Dessa forma, o método de TCA/Acetona foi definido como o melhor método extrator do que o Tris/TCA, uma vez que com ele foi possível obter maior número de géis a partir do mesmo extrato protéico com o mínimo de MF inicial. Além disso, o método de extração TCA/Acetona compreende menor número de etapas, sendo mais rápido, diminuindo erros atribuídos à manipulação.

Figura 4 – Eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida de folha e raiz de tomateiro cv. MT, obtidos com diferentes métodos de extração. Para todos os géis foram utilizados 500 µg de proteínas, submetidas a focalização isoeétrica de acordo com Saravanan e Rose (2004), em fitas de pH 3-10 com 18 cm, e após a eletroforese os géis foram corados com Coomassie Coloidal

4.2 Avaliação do efeito do Cd nas cultivares de tomateiro

4.2.1 Impacto do Cd no desenvolvimento das cultivares CR e PR

Após exposição ao Cd por quatro dias, as plantas apresentaram sintomas de clorose, dobramento e curvatura foliar (epinastia), manchas necróticas (Figura 5) e diminuição de crescimento (Figura 6), principalmente na cv. CR que é considerada mais sensível a este metal. Tais sintomas também foram observados nestas mesmas cultivares de tomateiro por Piotto (2012) nas concentrações de 25 e 100 μM de CdCl_2 , e também por López-Millán et al., (2009) nas concentrações de 10 e 100 μM de CdCl_2 em outra cultivar de tomateiro, sendo estes sintomas muito comuns em outras plantas cultivadas, como por exemplo em arroz (HAJDUCH et al., 2001).

Os principais sintomas morfológicos devido à toxidez por Cd são observados principalmente nos tecidos jovens, que estão em desenvolvimento e são os principais drenos fisiológicos, necessitando de maior demanda energética e consequentemente de nutrientes. Assim sintomas como clorose é apresentada majoritariamente em folhas novas (PIOTTO, 2012). No entanto, a concentração de Cd utilizada na presente pesquisa foi intermediária quando comparada às concentrações utilizadas no referido trabalho (25 e 100 μM de CdCl_2), e tal sintoma também foi observado nas folhas maduras de mudas de tomateiro, o que também foi observado por Hédiji et al. (2010) em outra cultivar de tomateiro.

De forma complementar, o estudo de Hajduch et al. (2001) relatou que os sintomas descritos acima são efeitos secundários da exposição a metais pesados como Cd, decorrentes da geração de ERO e consequentes danos ao sistema fotossintético e balanço oxidativo das células, que causam morte celular, ocasionando as necroses observadas.

Figura 5 – Sintomas morfológicos observados em tomateiros submetidos durante quatro dias a 50 μM de CdCl_2 . Na seta vermelha pode-se observar clorose nas folhas e necrose perto das nervuras. Na seta amarela é possível notar a epinastia das folhas

Figura 6 – Efeito do Cd no desenvolvimento dos tomateiros cv. Calabash Rouge e cv. Pusa Ruby, expostos durante quatro dias ao tratamento 0 μM de CdCl_2 e 50 μM de CdCl_2

4.2.2 Taxa de crescimento das cultivares expostas ao Cd

Segundo a CETESB (2005), o limite permitido de Cd em solo agrícola brasileiro é de 3 mg kg^{-1} , sendo a concentração de Cd escolhida para o tratamento similar a esse limite, $50 \text{ }\mu\text{M}$ de CdCl_2 corresponde a $3,2 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd. Além disso, Piotto (2012) descreve em seu trabalho que $50 \text{ }\mu\text{M}$ de CdCl_2 está dentro do intervalo de confiança que reduz pela metade o crescimento das plantas de tomateiro, incluindo essas variedades que foram estudadas.

Esses fatos citados acima levaram à escolha da concentração de $50 \text{ }\mu\text{M}$ de CdCl_2 , por ser uma concentração que afeta o metabolismo das plântulas, não chegando a causar a morte destas no período de exposição estudado. Assim, foi considerado que esta concentração seria a mais adequada para observar alterações proteômicas que ocorressem durante o período de exposição ao metal.

Como mencionado no item 4.2.1, um dos principais efeitos da exposição de vegetais ao Cd é a redução de seu crescimento. Desse modo, foi utilizada a análise de massa seca para verificar a intensidade do impacto do Cd sobre o desenvolvimento das mudas de tomateiro, expostas durante quatro dias a este metal. Essa análise foi posteriormente utilizada para realizar o cálculo do índice de tolerância (IT) das cultivares ao Cd (PIOTTO, 2012), na qual os resultados corroboraram com a pré-descrição das cultivares, sendo CR caracterizada como mais sensível ($\text{IT}_{\text{CR}} = 0,44 \pm 0,007$) e PR como sendo mais tolerante ($\text{IT}_{\text{PR}} = 0,57 \pm 0,035$) a este metal.

A massa seca da parte aérea (Figura 7 A) na ausência de Cd é maior na a cultivar CR do que na PR. O padrão de resposta é invertido na presença do metal, sendo que em tal condição, a cv PR acumula mais massa seca que a cv CR. Para a massa seca do sistema radicular não houve diferenças significativas entre as cultivares dentro dos tratamentos, mas há a diminuição efetiva da massa seca das mesmas, devido à exposição ao Cd (Figura 7 B).

De modo geral, a avaliação da massa seca total mostra que CR tem desenvolvimento mais expressivo do que a PR na ausência de Cd, mas quando expostas ao metal essa diferença é anulada, apresentando uma tendência de maior crescimento relativo de PR. Porém, ambas as massas totais das cultivares são afetadas na concentração de $50 \text{ }\mu\text{M}$ de CdCl_2 , mostrando o efeito negativo que o Cd provoca no desenvolvimento de ambas as plantas (Figura 7 C).

Quando uma dada planta é exposta a um determinado estresse abiótico, ela passa por uma fase de aclimatização, que é um estágio com elevado gasto energético, pois é necessário moldar o metabolismo para regulação do estresse, deixando de lado o metabolismo relacionado ao crescimento e desenvolvimento da planta (KOSOVÁ et al., 2011). Isso pode ajudar a explicar o crescimento diferencial das cultivares PR e CR na presença de Cd, ao se

comparar com as plantas que cresceram na ausência do Cd. Sob estresse, o metabolismo celular é redirecionado, sendo inibido o crescimento e biossíntese de células, assim como a fotossíntese, o que resulta em plantas menores (menos desenvolvidas).

Figura 7 - Acúmulo de massa seca nas cultivares CR e PR na ausência e presença de Cd, durante o período de quatro dias, expressa em mg planta⁻¹. (A) massa seca da parte aérea; (B) massa seca do sistema radicular; (C) massa seca total. Letras maiúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias entre genótipos de um mesmo tratamento, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias de um mesmo genótipo entre os tratamentos, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

4.2.3 Acúmulo de Cd nos tecidos

A quantificação de Cd nos tecidos de tomateiro das cultivares CR e PR foi realizada com a matéria seca utilizada na avaliação de massa seca, dividindo-se a planta em folhas, caule e raiz. O teor de Cd contido nos tecidos das plantas controle (0 μM de CdCl_2) foi detectada apenas em quantidades residuais (Tabela 5). No entanto, foi observado que os tecidos das plantas submetidas ao tratamento 50 μM de CdCl_2 , sobretudo no tecido radicular, acumularam Cd em quantidades significativas, de forma similar ao observado em outros trabalhos com tomateiro (DONG; WU; ZHANG, 2006; LÓPEZ-MILLÁN et al., 2009; HÉDIJI et al., 2010; GRATÃO et al., 2012).

O acúmulo de Cd nos tecidos de tomateiro depende da concentração do metal disponível na solução nutritiva e do tempo de exposição (LÓPEZ-MILLÁN et al., 2009; HÉDIJI et al., 2010). As cultivares aqui analisadas também foram estudadas por Piotto (2012), na mesma concentração de CdCl_2 , porém com maior tempo de exposição (sete dias), que proporcionou resultados diferenciais dos teores de Cd encontrados para o presente trabalho, entretanto, a exposição das cultivares por quatro dias em 25 μM CdCl_2 mostra tendência equivalente a apresentada na tabela 5. Embora tenha sido observada uma tendência de maior acúmulo de Cd nas raízes da cv CR e em caule e folhas da cv PR, tais diferenças não foram estatisticamente significativas entre ambas as cultivares, provavelmente devido ao curto tempo de exposição ao metal.

Demais trabalhos apresentam essa tendência ao acúmulo de Cd nos tecidos de tomateiro, e, sobretudo mostram a relação da presença do metal nos órgãos das plantas com a geração de estresse oxidativo (GRATÃO et al., 2008; MONTEIRO et al., 2011; GRATÃO et al., 2012). Dessa forma, a análise de quantificação de Cd teve por objetivo autenticar que o estresse detectado nas cultivares CR e PR foi ocasionado especialmente pela absorção e acúmulo do metal nos tecidos dessas plantas, sendo os contrastes detectados na análise 2-DE relativos a esse estresse.

Tabela 5 – Acúmulo de cádmio nos tecidos de tomateiro cv. CR e PR, após quatro dias de exposição às concentrações de 0 e 50 μM de CdCl_2

<i>Cultivar</i>	<i>Cd (mg kg⁻¹ massa seca)</i>					
	Folha		Caule		Raiz	
	0	50	0	50	0	50
CR	1,9 Ab	749,92 Aa	2,5 Ab	721,95 Ba	10,53 Ab	5909,83 Aa
PR	2,5 Ab	895,70 Aa	1,20 Ab	829,10 Aa	7,93 Ab	4945,87 Aa

Médias nas mesmas colunas seguidas por mesma letra maiúscula não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Médias nas mesmas linhas seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

4.2.4 Estresse oxidativo induzido pelo Cd

A produção de ERO é naturalmente inevitável, estando relacionado com o metabolismo aeróbico, ocorrendo nas plantas principalmente por meio da fotossíntese (PSI e PSII) no cloroplasto, na reação de fotorespiração no peroxissomo e na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, atuando também como moléculas sinalizadoras (APEL; HIRT, 2004).

Quando as proporções de ERO são rapidamente aumentadas no meio celular, geralmente na presença de estresse biótico ou abiótico, é caracterizado o estresse oxidativo (APEL; HIRT, 2004). A alta reatividade dessas moléculas podem ocasionar sérias modificações bioquímicas nos componentes celulares, tais como peroxidação de lipídeos, danos a proteínas e material genético, que podem levar à morte celular (MONTEIRO et al., 2011).

A síntese de ERO é concebida através da redução do O_2 em H_2O , na qual ocorre transferência de elétrons para O_2 resultando na formação de $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou $\text{HO}_2^{\cdot}$, H_2O_2 , e $^{\cdot}\text{OH}$, nessa determinada sequência. A forma protonada do radical superóxido ($\text{HO}_2^{\cdot}$) e o H_2O_2 podem atravessar as membranas biológicas e proporcionar a peroxidação dos ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), ao extrair prótons desses lipídeos (HALLIWELL; CHIRICO, 1993; GECHEV et al., 2006).

Essa perturbação aos lipídeos da membrana por ERO resulta na formação de vários aldeídos, tais como o malondialdeído (MDA), uma molécula de fácil detecção e quantificação por reação com TBA, sendo muito utilizada como indicador da existência de estresse oxidativo (DEWIR et al., 2006; AHSAN et al., 2007b). Ampla peroxidação lipídica da membrana trás sérios danos, como aumento da permeabilidade do plasma celular, diminuição

da fluidez, e danos secundários, como formação de conjugados com o DNA e proteínas pelos produtos da degradação dos aldeídos formados (GRATÃO et al., 2006; MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007).

Na presença de Cd, a cultivar PR apresentou menores níveis de MDA em folhas do que a cultivar CR (Figura 8), o que corrobora com a classificação de tolerância apresentada nos tópicos anteriores, pois se pode dizer que, ao encontrar níveis baixos de MDA, são também menores os danos celulares decorrentes do estresse oxidativo gerado pela presença do Cd nos tecidos vegetais.

A observação desses baixos teores de MDA em folha pode indicar que os danos celulares estão sendo menores em PR, o que pode ser decorrente da presença de um sistema antioxidante mais eficiente do que CR. Assim, a cv PR é supostamente mais eficaz na remoção, neutralização e limpeza de ERO, evitando as consequências negativas à célula (GRATÃO et al., 2006), ainda que o conteúdo de H_2O_2 tenha sido igualmente aumentado para ambas as cultivares na presença do Cd, tanto nos tecidos foliares quanto nas raízes (Figura 9).

O peróxido de hidrogênio não é a única ERO que age sobre a membrana, o que pode explicar a diferença de peroxidação lipídica do tecido foliar entre as cultivares, assim como ele pode desenvolver a função de mensageiro secundário e pode estar atuando nessa vertente no caso de PR (MITTLER, 2002; GECHEV et al., 2006; MØLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). Dessa forma, o H_2O_2 pode estar auxiliando na resposta ao estresse, promovendo a sinalização para expressão de genes de tolerância (APEL; HIRT, 2004). Assim, para investigar esses argumentos e as demais hipóteses levantadas no tópico 4.2, foi realizada a caracterização do perfil protéico bidimensional destes materiais, pois as alterações nos padrões de proteínas, em última análise, representam respostas diferenciais ao estresse pelo Cd em nível de expressão gênica.

Figura 8 – Conteúdo de malondialdeído (MDA) ($\mu\text{mol g}^{-1}$ massa fresca) nos tecidos de cv. CR e PR, expostas durante quatro dias nas concentrações de 0 e 50 μM de CdCl_2 . Letras maiúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias entre genótipos de um mesmo tratamento, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias de um mesmo genótipo entre os tratamentos, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Figura 9 – Conteúdo de peróxido de hidrogênio ($\mu\text{mol g}^{-1}$ massa fresca) nos tecidos de cv. CR e PR, expostas durante quatro dias as concentrações de 0 e 50 μM de CdCl_2 . Letras maiúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias entre genótipos de um mesmo tratamento, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias de um mesmo genótipo entre os tratamentos, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

4.3 Análise do proteoma das cultivares PR e CR

Foi demonstrado que, quando expostos ao Cd, as cultivares CR e PR tem comportamento diferenciais, por meio das análises apresentadas dentro no tópico 4.2, e também diante dos resultados observados no trabalho de Piotto (2012), o qual analisou as enzimas do sistema oxidante (SOD, CAT e GR) em ambas as cultivares sob estresse pelo Cd. Assim, o presente trabalho buscou compreender o mecanismo de sensibilidade e tolerância, dessas cultivares ao metal pesado Cd, por meio da avaliação de seus proteomas por 2-DE.

Uma vez determinado o método de extração mais adequado (vide item 4.1), as proteínas das cultivares Calabash Rouge e Pusa Ruby foram solubilizadas em TS e, posteriormente, as proteínas solúveis totais foram quantificadas. Os valores obtidos estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Quantificação de proteínas solúveis totais do material vegetal *Solanum lycopersicum* L.: cv Calabash Rouge, e cv. Pusa Ruby, utilizando do método de extração TCA/Acetona

Tratamento	Tecido Foliar		Tecido Radicular	
	Amostra	Total de Proteínas (mg mL ⁻¹)	Amostra	Total de Proteínas (mg mL ⁻¹)
0 µM CdCl ₂	CR.1	6,79	CR.1	4,13
	CR.2	5,51	CR.2	4,06
	CR.3	5,46	CR.3	3,95
	PR.1	4,79	PR.1	4,77
	PR.2	5,34	PR.2	4,40
	PR.3	3,90	PR.3	4,80
50 µM CdCl ₂	CR.1	3,06	CR.1	5,60
	CR.2	5,20	CR.2	6,77
	CR.3	4,78	CR.3	6,04
	PR.1	6,65	PR.1	5,70
	PR.2	4,12	PR.2	5,46
	PR.3	4,26	PR.3	5,74

Para verificar a integridade das proteínas extraídas foi realizada uma eletroforese em SDS-PAGE antes de iniciar a análise por 2-DE. A figura 10 exibe os géis obtidos, nos quais, de imediato não foi possível identificar diferenças proteicas significativas entre os tratamentos, nem mesmo entre as cultivares. Isso permitiu concluir que apenas a separação das proteínas por peso molecular não foi suficiente para a comparação dos proteomas desses materiais.

Dessa forma, ao utilizar a técnica 2-DE se obteve a separação da mistura complexa de proteínas solúveis das cultivares conforme seu ponto isoelétrico (pI) no eixo X, e também com o peso molecular das proteínas no eixo Y (KINTER; SHERMAN, 2000), o que possibilitou uma análise mais profunda e detalhada do material em resposta ao estresse.

Figura 10 - Perfil protéico em SDS-PAGE das cultivares de tomateiro Calabash Rouge (CR) e Pusa Ruby (PR), expostas ao tratamento de 0 μM CdCl_2 e 50 μM CdCl_2 por quatro dias. (P) Padrão BenchMarkTM Protein Ladder

4.3.1 Análise da expressão dos *spots* em eletroforese bidimensional

A análise dos proteomas das cultivares foram realizadas separadamente, caracterizando as alterações individuais que são exibidas pela cultivar mais tolerante (PR) e mais sensível (CR), o que permitiu focar nas modificações do perfil de proteínas em resposta ao Cd. Tais alterações proteicas são chamadas aqui de repressão e estímulo da expressão dos *spots*, de acordo com alterações detectadas nos volumes médios destes ao se comparar os proteomas das plantas submetidas ao tratamento 0 μM CdCl_2 com as do tratamento 50 μM CdCl_2 , o que está exemplificado na figura 11.

Figura 11 – Exemplo de repressão e estímulo na expressão dos *spots*. O primeiro esquema representa o *spot* 344 do tecido de raiz da cv. PR, e o segundo esquema representa o *spot* 30 do tecido de raiz da cv. PR. Os *spots* coloridos de amarelo são originários dos géis confeccionados a partir do material vegetal tratado com 0 μM CdCl₂, já os *spots* coloridos de verde são originários dos géis confeccionados a partir do material vegetal tratado com 50 μM CdCl₂. A última coluna representa a sobreposição dos picos dos diferentes tratamentos

Foi observado que o padrão de proteínas da cultivar CR foi bastante modificado na presença do metal, perante o maior número de *spots* visualizados tanto no tecido foliar (114) quanto no radicular (97), quando comparado com os tecidos das plantas submetidas ao tratamento sem Cd. Além disso, houve um maior número de *spots* estimulados do que reprimidos na presença do Cd, também em ambos os tecidos. Entretanto, para maior confiabilidade dos resultados, foi adotado que somente *spots* que apresentaram $p \leq 0,01$ foram considerados exclusivos (Tabela 7).

Tabela 7 – Número de *spots* encontrados na cultivar Calabash Rouge, para o tecido foliar e radicular. Na linha “0 & 50” estão os *spots* comuns a esses tratamentos. A linha “0” e a linha “50” apresentam *spots* exclusivos dos tratamentos 0 e 50 μM CdCl_2 , respectivamente

Calabash Rouge								
Tratamento (μM CdCl_2)	Spots Folha				Spots Raiz			
	n. de <i>spots</i>	ANOVA	Estimulados	Reprimidos	n. de <i>spots</i>	ANOVA	Estimulados	Reprimidos
0 & 50	456	30 *	29	1	440	32 *	23	9
0	3	0 **	-	-	52	3 **	-	-
50	114	8 **	-	-	97	2 **	-	-
Total	573	38	-	-	589	37	-	-

Foram considerados como *spots* estimulados aqueles que apresentaram volume 50% maior em relação ao controle, e *spots* reprimidos aqueles que apresentaram volume 50% inferior em relação ao controle

* 5% de significância; ** 1% de significância

Para a cultivar PR, o tecido foliar (16) apresentou menor quantidade de *spots* com variação significativa entre os tratamentos, ao se comparar com o tecido radicular (29). Apesar disso o proteoma de folha (15) e raiz (13) apresentou quase o mesmo número de *spots* estimulados na presença do metal. Porém, o tecido foliar apresentou mais *spots* exclusivos (48) ao tratamento 50 μM CdCl_2 , enquanto o maior número de *spots* exclusivos de raiz (89) pertence ao tratamento 0 μM CdCl_2 . A análise dos *spots* provenientes da raiz permitiu observar que a alteração na expressão dos *spots* comuns aos tratamentos manteve quase a mesma proporção entre estímulo (13) e repressão (16) (Tabela 8).

Tabela 8 – Número de *spots* encontrados na cultivar Pusa Ruby, para o tecido foliar e radicular. Na linha “0 & 50” estão os *spots* comuns a esses tratamentos. A linha “0” e a linha “50” apresentam *spots* exclusivos desses tratamentos

Pusa Ruby								
Tratamento (μM CdCl_2)	Spots Folha				Spots Raiz			
	n. de <i>spots</i>	ANOVA	Estimulados	Reprimidos	n. de <i>spots</i>	ANOVA	Estimulados	Reprimidos
0 & 50	642	16 *	15	1	405	29 *	13	16
0	21	1 **	-	-	89	10 **	-	-
50	48	2 **	-	-	12	1 **	-	-
Total	711	19	-	-	506	40	-	-

Foram considerados como *spots* estimulados aqueles que apresentaram volume 50% maior em relação ao controle, e *spots* reprimidos aqueles que apresentaram volume 50% inferior em relação ao controle

* 5% de significância; ** 1% de significância

Quando as duas cultivares foram comparadas, foi observado que o número de *spots* totais oriundos do tecido foliar é mais abundante na cultivar tolerante (PR) do que na cultivar sensível (CR). Já essa diferença do número de *spots* totais em raiz não é tão acentuada, sendo que a cultivar CR apresenta uma abundância de *spots* levemente maior que a cultivar PR (Tabela 7 e 8). Essas pequenas diferenças, juntamente com a alteração de *spots* diferentes, podem explicar porque a cultivar Pusa Ruby possui maior índice de tolerância ao Cd do que a cultivar Calabash Rouge. Essa hipótese somente será confirmada através do sequenciamento dos *spots* aqui detectados como diferenciais.

A tabela 9 apresenta o levantamento bibliográfico feito para a espécie *Solanum lycopersicum* L., que teve o proteoma estudado na busca do entendimento de sua resposta quando submetida a alguns tipos de estresse abiótico. Nesta tabela é possível verificar que poucos trabalhos de análise de proteomas por meio da técnica de 2-DE foram feitos nos últimos anos para essa espécie em relação a estresse abiótico (11), e que apenas um deles observou a resposta ao estresse por cádmio (RODRÍGUEZ-CELMA et al., 2010), e também um único trabalho avaliou a sensibilidade e tolerância, porém para salinidade (CHEN; GOLLOP; HEUER, 2009). Nenhum dos trabalhos apresentou as respostas de folha e raiz conjuntamente.

O trabalho de Rodríguez-Celma et al. (2010), avaliou a resposta de uma única cultivar de tomateiro em relação a diferentes concentrações de Cd (10 ou 100 μM CdCl_2), e encontrou somente 140 *spots* totais de raiz, e destes somente 77 *spots* foram considerados diferencialmente expressos (Tabela 9), um número muito inferior ao encontrado no presente trabalho, 506 *spots* para raiz.

A quantidade total de *spots* encontrados no perfil proteico de cv. CR e PR está dentro da média dos trabalhos apresentados na tabela 9, e avaliando os dados, é possível notar que a quantia de *spots* encontrados não está relacionado com o método de extração, já que o método Fenol (6) e TCA/Acetona (5) são igualmente utilizados, dependendo do tecido e quantidade de matéria fresca disponível para extração. Para tecidos oriundos do fruto foi usado o método de Fenol (2), já para tecido foliar foi utilizada a extração por TCA/Acetona (2), e para tecido radicular os dois métodos foram igualmente utilizados (Fenol-4; T/Acetona-3).

Enfim, todos esses *spots* que foram contabilizados nas tabelas 7 e 8 podem ser observados nas figuras 12-15, assim como a localização e identificação dos *spots* que serão processados para posterior identificação da proteína através do sequenciamento por espectrometria de massas. Além disso, os *spots* cujos volumes médios apresentaram

alterações, aparecem marcados em azul e em vermelho na representação dos géis de poliacrilamida nas figuras 12-15, e também podem ser observados graficamente nas figuras 16 e 17.

Tabela 9 – Estudos revelam proteoma de *Solanum lycopersicum* L. em resposta a estresses abióticos

(continua)

Material Vegetal e Tecido (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	Tratamento	Método de Análise	Total de Spots/ Spots diferencialmente expressos/ Proteínas identificadas	Referências
cv. Ailsa Craig Fruto – Pericarpo	Estresse hídrico (plantas totalmente irrigadas e com apenas 70% do total) frutos com 15 e 30 dias após a antese	Extração fenólica 500 µg de proteína/gel Fita de pH 4-7, 24 cm 2-DE com LC-MS/MS	1679/52/46	MARJANOVIĆ et al., 2012
var. p73 Fruto – Pericarpo	Armazenamento em baixas temperaturas (0 e 19 dias após armazenamento em 2 e 12 °C)	Extração fenólica Fita de pH 3-11, 24cm 2-D DIGE/MALDI-TOF-MS	818/61/23	SANCHEZ-BEL et al., 2012
cv. Supermarmande Raiz	Estresse salino por NaCl a 100 mM durante 14 dias	Extração fenólica 500 µg de proteína/gel Fita de pH 4-7, 24 cm 2-DE MALDI-TOF/MS	-/60/23	MANAA et al., 2011
cv. Tres Cantos Raiz	Estresse por Cd (0, 10 ou 100 µM CdCl ₂) durante 10 dias	Extração fenólica 100 µg de proteína/gel Fita de pH 5-8, 7 cm 2-DE MALDI-TOF-MS, LIFT TOF-TOF	140/77/53	RODRÍGUEZ-CELMA et al., 2010
cv. Patio e 'F144' (tolerante e sensível a salinidade) Radícula e Hipocótilo	Estresse salino por NaCl a 120 mM durante 7 dias após a germinação	Extração fenólica 60 µg de proteína/gel Fita de pH 4-7, 13 cm 2-DE LC-ESI-MS em DECA/LCQ	400/12 Patio e 13 'F144' para Radícula; 6 Patio e 8 'F144' parar Hipocótilo /23	CHEN; GOLLOP; HEUER, 2009
cv. Money Maker Raiz	Estresse por Al durante 14 dias	Extração com TCA/Acetona 50 µg de proteína por tratamento (150 µg /gel) Fita de pH 3-10, 24 cm 2D-DIGE-SDS-MALDI-TOF-TOF	>382/88/49	ZHOU et al., 2009

Tabela 9 – Estudos revelam proteoma de *Solanum lycopersicum* L. em resposta a estresses abióticos

(conclusão)

Material Vegetal e Tecido (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	Tratamento	Método de Análise	Total de Spots/ Spots diferencialmente expressos/ Proteínas identificadas	Referências
mutante <i>fer</i>, <i>wild-type</i>, e transgênico 35s1 Raiz	Deficiência de Fe (0,1, 10, 100 μM Fe) durante 8 dias	Extração com TCA 175 μg de proteína/gel Fita pH 3-10, 13 cm 2-DE MALDI-TOF MS ou LC-ESI-MS/MS	-/155/34	BRUMBAROVA et al., 2008
genótipo T3238 e mutantes T3238fer (Fe absorção ineficiente) Raiz	Deficiência de Fe	Extração com TCA/Acetona ~200 μg de proteína/gel Fita de pH 3-10, 24cm 2-DE MALDI-TOF MS	>1400/200/97	LI et al., 2008
cv. Koma Folha	Estresse hídrico (alagamento durante 72 h)	Extração com TCA/Acetona ou Mg/ NP-40 com fracionamento em PEG 4000 350 ug de proteína/gel Tubo gel pH 3-10, 18 cm 2-DE MALDI-TOF MS ou ESI-MS/MS	1500/52/33	AHSAN et al., 2007c
cv. Koma Raiz	Estresse hídrico (alagamento durante 24 e 72h)	Extração fenólica 500 μg de proteína/gel Fita pH 4–7, 18 cm 2-DE MALDI-TOF MS	-/35/29	AHSAN et al., 2007b
var. Better Boy Folha	Estresse luminoso (redução da intensidade da luz incidente em 95%) durante 58 dias	Extração com TCA/Acetona 50 μg de proteína por tratamento Fita pH 3-10, 24 cm 2D-DIGE nanoLC-MS/MS	1180/59/59	HATTRUP et al., 2007

Figura 12 - Eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida de folha de tomateiro cv. CR. em fitas de pH 4-7 com 18 cm, corados com Coomassie Coloidal. Tratamentos 0 μM CdCl_2 (A) e 50 μM CdCl_2 (B). Círculos azuis representam aumento de expressão dos *spots* no tratamento 50 μM CdCl_2 ; círculos vermelhos diminuição da expressão dos *spots* no tratamento 50 μM CdCl_2 ; círculos verdes são *spots* exclusivos do tratamento 0 μM CdCl_2 e círculos amarelos são *spots* exclusivos do tratamento 50 μM CdCl_2 . Os números nos *spots* são suas identificações

Figura 13 - Eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida de raiz de tomateiro cv. CR. em fitas de pH 4-7 com 18 cm, corados com Coomassie Coloidal. Tratamentos 0 μM CdCl_2 (A) e 50 μM CdCl_2 (B). Círculos azuis representam aumento de expressão dos *spots* no tratamento 50 μM CdCl_2 ; círculos vermelhos diminuição da expressão dos *spots* no tratamento 50 μM CdCl_2 ; círculos verdes são *spots* exclusivos do tratamento 0 μM CdCl_2 e círculos amarelos são *spots* exclusivos do tratamento 50 μM CdCl_2 . Os números nos *spots* são suas identificações

Figura 14 - Eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida de folha de tomateiro cv. PR. em fitas de pH 4-7 com 18 cm, corados com Coomassie Coloidal. Tratamentos 0 μM CdCl_2 (A) e 50 μM CdCl_2 (B). Círculos azuis representam aumento de expressão dos *spots* no tratamento 50 μM CdCl_2 ; círculos vermelhos diminuição da expressão dos *spots* no tratamento 50 μM CdCl_2 ; círculos verdes são *spots* exclusivos do tratamento 0 μM CdCl_2 e círculos amarelos são *spots* exclusivos do tratamento 50 μM CdCl_2 . Os números nos *spots* são suas identificações

Figura 15 - Eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida de raiz de tomateiro cv. PR. em fitas de pH 4-7 com 18 cm, corados com Coomassie Coloidal. Tratamentos 0 μM CdCl_2 (A) e 50 μM CdCl_2 (B). Círculos azuis representam aumento de expressão dos *spots* no tratamento 50 μM CdCl_2 ; círculos vermelhos diminuição da expressão dos *spots* no tratamento 50 μM CdCl_2 ; círculos verdes são *spots* exclusivos do tratamento 0 μM CdCl_2 e círculos amarelos são *spots* exclusivos do tratamento 50 μM CdCl_2 . Os números nos *spots* são suas identificações

Figura 16 – Representação gráfica da comparação de médias da porcentagem de volume (eixo y) dos *spots* do tecido foliar (A) e radicular (B) da cultivar Calabash Rouge, conforme os tratamentos de 0 μM CdCl₂ (barras brancas) e 50 μM CdCl₂ (barras cinzas). No eixo x estão identificados os *spots* que exibiram $p < 0,05$

Figura 17 - Representação gráfica da comparação de médias da porcentagem de volume (eixo y) dos *spots* do tecido foliar (A) e radicular (B) da cultivar Pusa Ruby, conforme os tratamentos de 0 μM CdCl₂ (barras brancas) e 50 μM CdCl₂ (barras cinzas). No eixo x estão identificados os *spots* que exibiram p<0,05

Os *spots* de interesse do presente estudo proteômico não foram identificados, porém, segundo a revisão de literatura várias vias metabólicas possuem respostas proteicas conservadas à diferentes estresses abióticos, que foram identificadas pela observação da abundância diferencial de proteínas resolvidas em 2-DE (SAMAJ; THELEN; 2007).

Estas análises proteômicas permitiram ao longo dos anos delinear as funções metabólicas que são afetadas na presença do cádmio. Vários trabalhos relataram alterações na expressão de proteínas relacionadas à fotossíntese, metabolismo de carboidratos e carbono, metabolismo energético, sistema antioxidante da resposta ao estresse, e metabolismo da glutathione, sendo esses os principais grupos funcionais ligados ao estresse ocasionado por Cd, assim como por outros fatores abióticos (AHSAN; RENAUT; KOMATSU, 2009; KOSOVÁ et al., 2011; EVERS et al., 2012).

A diminuição da abundância da RuBisCo, a proteína que representa até 50% do total de proteínas solúveis de folha (ROSSIGNOL et al., 2006), é normalmente observada em trabalhos de estresse por metais pesados, e foi relacionada com a exibição de sintomas morfológicos como clorose e manchas necróticas (HAKEEM et al., 2012), que foram encontrados nas cultivares de tomateiro analisados (tópico 4.2.1), porém apenas um *spot* com redução significativa foi encontrado para cada cultivar nos géis relativos a folha (Figura 16.A – *spot* 281; Figura 17.A – *spot* 483).

O trabalho de Zhao et al. (2011) identificou diversos *spots* relacionados a fotossíntese para o proteoma foliar de *Phytolacca americana*, uma espécie hiperacumuladora de Cd. Seis *spots* foram identificados como subunidade maior da RuBisCo e um como subunidade menor, e todos apresentaram a abundância diminuída no mínimo de duas vezes na presença do Cd. Além disso, esse trabalho exemplifica como é diversificado o posicionamento das subunidades pertencentes a RuBisCo no gel de poliacrilamida, que apresentou ampla distribuição na faixa de pH e de peso molecular. Neste sentido, os *spots* que exibiram diminuição nos géis foliares das cultivares, podem estar relacionados a fotossíntese e ser uma subunidade da RuBisCo (Figura 12 e 14, *spots* circulosados de vermelhos).

Além disso, a detecção de subunidades de RuBisCo e de outras proteínas no gel de poliacrilamida de plantas submetidas a estresse abióticos são relacionadas com a degradação de proteínas, que por sua vez podem estar ligadas a presença do estresse oxidativo (SAMAJ; THELEN; 2007; CARUSO et al., 2009). O aumento de ERO e a presença de estresse oxidativo foram observados nas cultivares PR e CR através da quantificação de peróxido de hidrogênio (Figura 9) e do MDA (Figura 8), o que pode estar relacionado com a diminuição da abundância dos *spots* de folha e raiz (Figura 16 e 17).

A presença de ERO também promove aumento na abundância de muitos *spots*, principalmente de enzimas relacionadas ao sistema osmoprotetor e antioxidante, sendo que para esse trabalho a maioria das alterações na abundância de *spots* foram positivas, ou seja, na presença do Cd houve aumento na expressão dos *spots* (Figura 12 e 14, *spots* circulados de azul), alguns desses podem pertencer a esse grupo de proteínas protetoras, que estão na maioria das vezes proteínas envolvidas na via de biossíntese GSH e chaperonas (HAKEEM et al., 2012).

Quase metade dos *spots* que apresentaram aumento na abundância em raiz de arroz exposta ao Cd (7/16) foram identificadas como proteínas relacionadas ao estresse oxidativo por Lee et al. (2010). Essas proteínas foram identificadas como GST, GS, GSH reductase (GR), peroxidase, suposta ferredoxina: NADP(H) oxirredutase. Além da GSH ser um metabólito antioxidante, também é precursora da fitoquelatina (PC), uma proteína com função quelante e de alta afinidade com Cd, assim desempenha importante papel na resposta e tolerância a esse estresse (GRATÃO et al., 2005; AZEVEDO et al., 2012). Dessa forma, manter altos níveis de GSH constitui uma estratégia importante para a síntese de PCs, sendo que para isso, um aumento na atividade da GR se torna necessário. Ademais, para ocorrer a biossíntese ativa de GSH é necessário a presença de seus precursores, exigindo abundância de cisteína e alta atividade da γ -glutamylcisteína sintetase (γ -ECS) (JOZEFCZAK et al., 2012; NOCTOR et al., 2012).

Alguns *spots* correspondentes a Glutamina sintetase, Glutathione S-transferase, Glicina descarboxilase (GCD) tiveram sua abundância elevada na presença de Cd em folha de *A. Thaliana* (SEMANE et al., 2010). Segundo Semane et al (2010) o aumento destas proteínas estariam relacionados com a biossíntese cisteína, conversão de glutamina à glutamato e regulação de γ -ECS, o que reforça a importância da GSH na defesa da planta sob esse determinado estresse.

Ainda se tratando da observação do aumento de abundância de *spots* relacionados ao sistema de defesa e osmoprotetor, Rodríguez-Celma et al. (2010) identificaram alteração positiva de cinco chaperonas da raiz de tomateiro, entre elas proteína de choque térmico HSP68 e HSP60, subunidade beta da chaperonina 60, suposta proteína com repetição TPR (*tetratricopeptide repeat*), além da presença de duas proteases. Segundo os autores, as chaperoninas podem atuar prevenindo a desnaturação de proteínas ocasionada pela presença do Cd no citossol, e as proteases podem reciclar as proteínas que perderam sua conformação devido a presença desse metal e por sua atuação na geração indireta de ERO.

O metabolismo energético da planta também é influenciado na presença de cádmio. A subunidade beta da ATP sintase exibiu alteração de abundância na presença de Cd nos trabalhos de Zhao et al. (2011) e Rodríguez-Celma et al. (2010), porém sua expressão foi estimulada em um, e reprimida em outro. Durand et al. (2010) identificaram cinco ATPases no tecido foliar de *Populus*, e verificaram que três pertenciam ao cloroplasto e tiveram sua expressão inibida, ao passo que as outras duas pertenciam a mitocôndria e foram estimuladas em sua expressão. Esses dados confirmam que a fotossíntese é inibida na presença de Cd, enquanto a respiração é estimulada, o que corrobora com o aumento de proteínas envolvidas na glicólise e no ciclo do ácido cítrico (SARRY et al., 2006; KIEFFER et al., 2008; KIEFFER et al., 2009; VILLIERS et al., 2011).

Independentemente de qual estresse é aplicado e de que espécie vegetal é utilizada, a maior parte das proteínas diferencialmente expressas identificadas na literatura parecem ser constitutivamente presentes ou são induzidas especificamente nas plantas resistentes ou tolerantes a estresses biótico e abióticos (ROSSIGNOL et al., 2006). No entanto, isso não significa que todos os *spots* que apresentaram alteração em sua abundância no presente trabalho já tenham sido relacionadas com a resposta de tolerância/sensibilidade a metais pesados, considerando que cada espécie possui uma bagagem genética exclusiva.

Assim, o futuro sequenciamento desses *spots* possibilitará conhecer as respostas exclusivas de tomateiro em exposição ao cádmio. Além disso, a literatura ainda não descreve nenhuma comparação do proteoma de uma espécie cultivada sensível e tolerante a esse metal. Portanto, esse estudo pode, potencialmente, tornar-se referência no assunto.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As duas cultivares de tomateiro apresentaram comportamento diferenciado em resposta à presença de 0 e 50 μM de CdCl_2 , o que corrobora com o índice de tolerância que classificou a cv. Calabash Rouge (CR) como sensível e Pusa Ruby (PR) como tolerante ao cádmio.

As diferenças que permitem afirmar essa classificação englobou os resultados de indicadores morfológicos, fisiológicos e bioquímicos de estresse na presença do Cd, tais como clorose foliar acentuada em CR, inversão da taxa de crescimento entre as cultivares, aumento da concentração de MDA (folha) e H_2O_2 (folha e raiz) em ambas as cultivares, além de alterações no proteoma de folha e raiz.

A quantificação de Cd nos tecidos permitiu concluir que todos os resultados obtidos estão relacionados com a presença desse metal nos órgãos das cultivares, o que conduz à geração indireta de ERO. Por sua vez, as ERO estão relacionadas com várias alterações no proteoma de plantas, danificando diretamente as proteínas ao oxidá-las, ou indiretamente, promovendo o aumento da expressão de proteínas ligadas ao sistema antioxidante enzimático e não enzimático, com grande destaque para o papel da glutatona e das fitoquelatinas na tolerância ao Cd.

As alterações observadas no proteoma de ambas as cultivares podem estar relacionadas às respostas constitutivas dos vegetais ao estresse. Entretanto, a identificação dos *spots* diferencialmente expressos podem revelar novas proteínas relacionadas a tolerância e sensibilidade ao Cd, e a outros metais pesados, em plantas cultivadas.

Ademais, também foi verificado que o método de extração de proteínas solúveis utilizado é muito importante na veracidade e reprodutibilidade das análises 2-DE, sendo considerado, entre quatro métodos de extração, a metodologia TCA/Acetona como a mais indicada para os tecidos de folha e raiz de tomateiro.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, G. K.; PEDRESCHI, R.; BARKLA, B. J.; BINDSCHEDLER, L. V.; CRAMER, R. SARKAR, A.; RENAUT, J.; JOB, D.; RAKWAL, R. Translational plant proteomics: a perspective. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 15, p. 4588-4601, 2012.
- AHSAN, N.; LEE, S.; LEE, D.; LEE, H.; LEE, S.; BAHK, J.; LEE, B. Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity. **Comptes Rendus Biologies**, Amsterdam, v. 330, n. 10, p. 735-746, 2007a.
- AHSAN; LEE, D.G.; LEE, S.H.; LEE, K.W.; BAHK, J. D.; LEE, B. A proteomic screen and identification of waterlogging-regulated proteins in tomato roots. **Plant and Soil**, The Hague, v. 295, n. 1/2, p. 37-51, 2007b.
- AHSAN; LEE, D.-G.; LEE, S.-H.; KANG, K. Y.; BAHK, J. D. CHOI, M. S.; LEE, I.; RENAUT, J.; LEE, B. A comparative proteomic analysis of tomato leaves in response to waterlogging stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 131, n. 4, p. 555-570, 2007c.
- AHSAN, N., RENAUT, J.; KOMATSU, S. Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. **Proteomics**, Weinheim, v. 9, n. 10, p. 2602-2621, 2009.
- AINA, R.; LABRA, M.; FUMAGALLI, P.; VANNINI, C.; MARSONI, M.; CUCCHI, U.; BRACALE, M.; SGORBATI, S.; CITTERIO, S. Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 59, n. 3, p. 381-392, 2007.
- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, 2001.
- ALLOWAY, B.J. **Heavy metal in soils**. 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995. 368p.
- AMALRAJ, R. S.; SELVARAJ, N.; VELUSWAMY, G. K.; RAMANUJAN, R. P.; MUTHURAJAN, R.; PALANIYANDI, M.; AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R.; VISWANATHAN, R. Sugarcane proteomics: establishment of a protein extraction method for 2-DE in stalk tissues and initiation of sugarcane proteome reference map. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 31, n. 12, p. 1959-1974, 2010.
- ALVAREZ, S.; BERLA, B. M.; SHEFFIELD, J.; CAHOON, R. E.; JEZ, J. M.; HICKS, L. M. Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. **Proteomics**, Weinheim, v. 9, n. 9, p. 2419-2431, 2009.
- APEL; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.

AZEVEDO, R.A.; GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; CARVALHO, R.F. What is new in the research on cadmium-induced stress in plants? **Food and Energy Security**, Wellesbourne, v. 1, n. 2, p. 133-140, 2012.

BAGINSKY, S. Plant proteomics : concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, n. 1, p. 93- 120, 2009.

BARBOSA, H.S.; ARRUDA, S.C.C.; AZEVEDO, R.A; ARRUDA, M.A.Z. New insights on proteomics of transgenic soybean seeds: evaluation of differential expressions of enzymes and proteins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 402, n. 1, p. 299-314, 2012.

BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 160, p. 268-282, 1937.

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

BRUMBAROVA, T.; MATROS, A.; MOCK, H.P.; BAUER, P.A. Proteomic study showing differential regulation of stress, redox regulation and peroxidase proteins by iron supply and the transcription factor FER. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, London, v. 54, n. 2, p. 321-334, 2008.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G.M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P.G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.

CARUSO, G.; CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUBBIOTTI, R.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. **Plant Science**, Kidlington, v. 177, n. 6, p. 570-576, 2009.

CETESB. Valores orientados para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo. São Paulo, 2005. 4p.

CHEN; GOLLOP, N.; HEUER, B. Proteomic analysis of salt-stressed tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings: effect of genotype and exogenous application of glycinebetaine. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 7, p. 2005-2019, 2009.

CHENG, L.; GAO, X.; LI, S.; SHI, M.; JAVEED, H.; JING, X.; YANG, G.; HE, G. Proteomic analysis of soybean [*Glycine max* (L.) Meer.] seeds during imbibition at chilling temperature. **Molecular Breeding**, Dordrecht v. 26, n. 1, p. 1-17, 2010.

COX, J.; MANN, M. Is proteomics the new genomics? **Cell**, London, v. 130, n. 3, p. 395-398, 2007.

DEWIR, Y.H.; CHAKRABARTY, D.; ALI, M.B.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 58, n. 1/3, p. 93-99, 2006.

DONG, J.; WU, F.; ZHANG, G. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). **Chemosphere**, Oxford, v. 64, n. 10, p. 1659-1666, 2006.

DURAND, T.C; SERGEANT, K.; PLANCHON, S.; CARPIN, S.; LABEL, P.; MORABITO, D.; HAUSMAN, J.-F.; RENAUT, J. Acute metal stress in *Populus tremula* x *P. alba* (717-1B4 genotype): leaf and cambial proteome changes induced by cadmium 2+. **Proteomics**, Weinheim, v. 10, n. 3, p. 349-468, fev. 2010.

EVERS, D.; LEGAY, S.; LAMOUREUX, D.; HAUSMAN, J.F.; HOFFMANN, L.; RENAUT, J. Towards a synthetic view of potato cold and salt stress response by transcriptomic and proteomic analyses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 78, n. 4/5, p. 503-514, 2012.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 28 de fev. de 2013.

GAO, Y.; ZHOU, P.; MAO, L.; SHI, W.J.; ZHI, Y.E. Phytoextraction of cadmium and physiological changes in *Solanum nigrum* as a novel cadmium hyperaccumulator. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 57, p. 501-508, 2010.

GE Healthcare, 2-D Eletrophoresis Principles and Methods, 2004.

GECHEV, T.S.; VAN BREUSEGEM, F.; STONE, J.M.; DENEV, I.; LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays**: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, Moscou, v. 28, n. 11, p. 1091-1101, 2006.

GLICK, B.R.. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. **Biotechnology Advances**, New York, v. 28, n. 3, p. 367-374, 2010.

GOMES-JUNIOR, R.A; MOLDES, C.A; DELITE, F.S. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 8, p. 1330-1337, 2006.

GÖRG, A.; DREWS, O.; LÜCK, C.; WEILAND, F.; WEISS, W. 2-DE with IPGs. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 30, n 1, p. 122-132, 2009.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Review: Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 32, p. 481-494, 2005.

GRATÃO, P.L.; POMPEU, G.B.; CARDOSO, P.F.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Plant antioxidant responses to toxic elements. **Current Topics in Biochemical Research**, New York, v. 8, p. 41-70, 2006.

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ANTUNES, A.M.; PERES, L.E.P.; AZEVEDO, R.A. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 153, n. 3, p. 321-333, 2008.

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C; CARVALHO, R.F.; TEZOTTO, T.; PIOTTO, F.A.; PERES, L.E. P.; AZEVEDO, R.A. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 56, p. 79-96, 2012.

GUIMARÃES, M.D.A.; SANTANA, T.A.; SILVA, E.V; ZENZEN, I. L.; LOUREIRO, M. E. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 58-68, 2008.

GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R.; AEBERSOLD, R. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 19, n. 3, p. 1720-1730, 1999.

HAJDUCH, M.; RAKWAL, R.; AGRAWAL, G.K.; YONEKURA, M.; PRETOVA, A. High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: Drastic reductions/ fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress- related proteins. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 22, p. 2824-2831, 2001.

HAKEEM, K.R.; CHANDNA, R.; AHMAD, P.; IQBAL, M.; OZTURK, M. Relevance of proteomic investigations in plant abiotic stress physiology. **Omics: a journal of integrative biology**, Boston, v. 16, n. 11, p. 621-35, 2012.

HALLIWELL, C.S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 57, p. 715-725, 1993.

HARRY, J.L.; WILKINS, M.R.; HERBERT, B.R.; PACKER, N.H.; GOOLEY, A.A.; WILLIAMS, K.L. Proteomics : Capacity versus utility, **Electrophoresis**, Weinheim, v . 21, p. 1071-1081, 2000.

HATTRUP, E.; NEILSON, K.A; BRECI, L.; HAYNES, P.A. Proteomic analysis of shade-avoidance response in tomato leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 21, p. 8310-8, 2007.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics an stoichiometry of fatty peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 125, p. 189-198, 1968.

HÉDIJI, H.; DJEBALI, W.; CABASSON, C.; MAUCOURT, M.; BALDET, P.; BERTRAND, A.; BOULILA ZOGLAMI, L.; DEBORDE, C.; MOING, A.; BROUQUISSE, R.; CHAÏBI, W.; GALLUSCI, P. Effects of long-term cadmium exposure on growth and metabolomic profile of tomato plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, n. 8, p. 1965-74, 2010.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, v. 347, n.34, p.1-32, 1950.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Dez. de 2011.

ISAACSON, T.; DAMASCENO, C.M.B.; SARAVANAN, R.S. HE, Y.; CATALÁ, C.; SALADIÉ, M.; ROSE, J.K.C. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 2, p. 769-774, 2006.

JOZEFCZAK, M.; REMANS, T.; VANGRONSVELD, J.; CUYPERS, A. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. **International Journal of Molecular Sciences**, Guildford, v. 13, n. 3, p. 3145-3175, 2012.

KIEFFER, P.; PLANCHON, S.; OUFIR, M.; ZIEBEL, J.; DOMMES, J.; HOFFMANN, L.; HAUSMAN, J.; RENAUT, J. Combining proteomics and metabolite analyses to unravel cadmium stress-response in poplar leaves. **Journal of proteome research**, Washington, v. 8, n. 1, p. 400-417, 2008.

KIEFFER, P.; SCHRÖDER, P.; DOMMES, J.; HOFFMANN, L.; RENAUT, J.; HAUSMAN, J. Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 72, n. 3, p. 379-396, 2009.

KINTER, M.; SHERMAN, N.E. Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. **Wiley-Interscience**, New York, 200, 301p.

KIRKHAM, M.B. Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. **Geoderma**, Amsterdam, v. 137, n. 1-2, p. 19-32, 2006.

KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I.T.; RENAUT, JENNY. Plant proteome changes under abiotic stress-contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 8, p. 1301-1322, 2011.

LARCHER W. (1929) **Physiological plant ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Funcional Groups**. Ed 4. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 2003. p. 513

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMEGO, F.P.; VIDAL, R. A. Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição? **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 17, p. 9-18, 2007.

LEE, J.; JIANG, W.; QIAO, Y.; CHO, Y.; WOO, M.; CHIN, J.; KWON, S.; HONG, S.; CHOI, I.; KOH, H. Shotgun proteomic analysis for detecting differentially expressed proteins in the reduced culm number rice. **Proteomics**, Weinheim, v. 11, n. 3, p. 455-468, 2011.

LEE, K.; BAE, D.W.; KIM, S.H.; HAN, H.J.; LIU, X.; PARK, H.C.; LIM, C.O.; LEE, S.Y.; CHUNG, W.S. Comparative proteomic analysis of the short-term responses of rice roots and leaves to cadmium. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, n. 3, p. 161-168, 2010.

LI, J.; WU, X.-D.; HAO, S.-T.; WANG, X.-J.; LING, H.-Q. Proteomic response to iron deficiency in tomato root. **Proteomics**, Weinheim, v. 8, n. 11, p. 2299-2311, 2008.

LIMA, J.E.; CARVALHO, R.F.; NETO, A.T.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E.P. Micro-MsK: a tomato genotype with miniature size, short life cycle, and improved in vitro shoot regeneration. **Plant Science**, Limerick, v. 167, p. 753-757, 2004.

LÓPEZ-MILLÁN, A.-F.; SAGARDOY, R.; SOLANAS, M.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 65, n. 2-3, p. 376-385, 2009.

LUX, A.; MARTINKA, M.; VACULÍK, M.; WHITE, P. J. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 21-37, 2011.

MALAVOLTA, E. **Fertilizante e seu impacto ambiental: micronutrientes e metais pesados mitos, mistificação e fatos**. São Paulo: Produquímica, 1994. 153p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações. Ed. 2. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa de Potassa e do Fosfato, 1997. 319p.

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 157, p. 183-193, 2000.

MANAA, A.; AHMED, H. BEN; SMITI, S.; FAUROBERT, M. Salt-stress induced physiological and proteomic changes in tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings. **Omics : a journal of integrative biology**, Boston, v. 15, n. 11, p. 801-809, 2011.

MARJANOVIĆ, M.; STIKIĆ, R.; VUCELIĆ-RADOVIĆ, B.; SAVIĆ, S.; JOVANOVIĆ, Z.; BERTIN, N.; FAUROBERT, M. Growth and proteomic analysis of tomato fruit under partial root-zone drying. **Omics: a journal of integrative biology**, Boston, v. 16, n. 6, p. 343-356, 2012.

MARTINS, P.F.; CARVALHO, G.; GRATÃO, P.L.; DOURADO, M.N.; PILEGGI, M.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, R.A. Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. **Process Biochemistry**, London, v. 46, n. 5, p. 1186-1195, 2011.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MØLLER, I.M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 459-481, 2007.

MONTEIRO, C.C.; CARVALHO, R.F.; GRATÃO, P.L. CARVALHO, G.; TEZOTTO, T.; MEDICI, L.O.; PERES, L.E.P.; AZEVEDO, R.A. Biochemical responses of the ethylene-insensitive Never ripe tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 71, n. 2, p. 306-320, 2011.

NAGAJYOTI, P.C.; LEE, K.D.; SREEKANTH, T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, Secaucus, v. 8, n. 3, p. 199-216, 2010.

NICHOLSON, F.A.; SMITH, S.R.; ALLOWAY, B.J.; CARLTON-SMITH, C.; CHAMBERS, B.J. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. **The Science of the total environment**, Amsterdam, v. 311, n. 1/3, p. 205-219, 2003.

NOCTOR, G.; MHAMDI, A.; CHAOUCH, S.; HAN, Y.; NEUKERMANS, J.; MARQUEZ-GARCIA, B.; QUEVAL, G.; FOYER, C. H. Glutathione in plants: an integrated overview. **Plant, cell & environment**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 454-484, 2012.

NRIAGU, J. O. A silent epidemic of environmental metal poisoning? **Environmental Pollution**, Barking, v. 50, p. 139-161, 1988.

PANDHAIR, V.; SEKHON, B.S. Reactive oxygen species and antioxidants in plants: an overview. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**. New Delhi, v. 15, p. 71-78, 2006.

PILON-SMITS, E.A. H.; ZHU, Y.L.; SEARS, T.; TERRY, N. Overexpression of glutathione reductase in *Brassica juncea*: Effects on cadmium accumulation and tolerance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 110, n. 4, p. 455-460, 2000.

PINO, L.E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M.S.; SCOTTON, D.C.; BORGIO, L.; QUECINI, V.; FIGUEIRA, A.; PERES, L.E. The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato “Micro-Tom” model system. **Plant methods**, Oxford, v. 6, p. 23, 2010.

PINO-NUNES, L.E. **Obtenção e uso de mutantes com alterações no balance auxina/citocinina no estudo da competência organogênica em micro-tomateiro (*Lycopersicum esculentum* cv. Micro-Tom)**. 2005. 73p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

PIOTTO, F.A. **Avaliação de tolerância ao Cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)** 2012. 144p. Tese (Doutorado em Ciências: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

RODRÍGUEZ-CELMA, J.; RELLÁN-ALVAREZ, R.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J.; LÓPEZ-MILLÁN, A.-F. Changes induced by two levels of cadmium toxicity in the 2-DE protein profile of tomato roots. **Journal of proteomics**, Amsterdam, v. 73, n. 9, p. 1694-1706, 2010.

ROSSIGNOL, M.; PELTIER, J.-B.; MOCK, H.-P.; MATROS, A.; MALDONADO, A.M.; JORRÍN, J. V. Plant proteome analysis: a 2004-2006 update. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 20, p. 5529-5548, 2006.

SABLOK, G.; WU, X.; KUO, J.; NAYAK, K.C.; BAEV, V.; VAROTTO, C.; ZHOU, F. Combinational effect of mutational bias and translational selection for translation efficiency in tomato (*Solanum lycopersicum*) cv. Micro-Tom. **Genomics**, San Diego, v. 101, n. 5, p. 290-295, 2013.

SAMAJ, J.; THELEN, J.J. (Eds.). **Plant Proteomics**. New York: Springer, 2007, p.369.

SANCHEZ-BEL, P.; EGEA, I.; SANCHEZ-BALLESTA, M.T.; SEVILLANO, L.; DEL CARMEN BOLARIN, M.; FLORES, F.B. Proteome changes in tomato fruits prior to visible symptoms of chilling injury are linked to defensive mechanisms, uncoupling of photosynthetic processes and protein degradation machinery. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 53, n. 2, p. 470-484, 2012.

SANJAYA, P.; HSIAO, P.-Y.; SU, R.-C.; KO, S.-S.; TONG, C.-G.; YANG, R.-Y.; CHAN, M.-T. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* tryptophan synthase beta 1 (AtTSB1) in *Arabidopsis* and tomato confers tolerance to cadmium stress. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 1074-1085, 2008.

SARAVANAN, R.S.; ROSE, J.K.C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, n. 9, p. 2522-2532, 2004.

SARRY, J.-E.; KUHN, L.; DUCRUIX, C.; LAFAYE, A.; JUNOT, C.; HUGOUVIEUX, V.; JOURDAIN, A.; BASTIEN, O.; FIEVET, J.B.; VAILHEN, D.; AMEKRAZ, B.; MOULIN, C.; EZAN, E.; GARIN, J.; BOURGUIGNON, J. The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 7, p. 2180-2198, 2006.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SEMANE, B.; DUPAE, J.; CUYPERS, A.; NOBEN, J.-P.; TUOMAINEN, M.; TERVAHAUTA, A.; KÄRENLAMPI, S.; VAN BELLEGHEM, F.; SMEETS, K.; VANGRONVELD, J. Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, n. 4, p. 247-54, 2010.

SHEORAN, I.S.; ROSS, ANDREW R.S.; OLSON, DOUGLAS J.H.; SAWHNEY, V.K. Proteomic analysis of tomato (*Lycopersicon esculentum*) pollen. **Access**, Chicago, v. 58, n. 13, p. 3525-3535, 2007.

SHEORAN, I.S.; ROSS, ANDREW R.S.; OLSON, DOUGLAS J.H.; SAWHNEY, V.K. Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis. **Plant Science**, Limerick, v. 176, n. 1, p. 99-104, 2009.

SINGH, A.; SHARMA, R.K.; AGRAWAL, M.; MARSHALL, F.M. Health risk assessment of heavy metals via dietary intake of foodstuffs from the wastewater irrigated site of a dry tropical area of India. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.48, n.2, p.611-619, 2010.

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

The Tomato Genome Consortium, The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution, **Nature**, London, v. 485, p. 635-641, 2012.

THIELLEMENT, H.; ZIVY, C. D.; DAMERVAL, C.; MÉCHIN, V. (Eds.) **Plant Proteomics: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2007, p. 399.

VEASEY, E.A.; PIOTTO, F.A.; NASCIMENTO, W.F.; RODRIGUES, J.F.; MEZETTE, T.F.; BORGES, A.; BIGUZZI, F.A.; SANTOS, F.R.C.; SOBIERAJSKI, G.R.; RECCHIA, G.H.; MISTRO, J.C. Processos evolutivos e a origem das plantas cultivadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1218-1228, 2011.

VILLIERS, F.; DUCRUIX, C.; HUGOUVIEUX, V.; JARNO, N.; EZAN, E.; GARIN, J.; JUNOT, C.; BOURGUIGNON, J. Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches. **Proteomics**, Weinheim, v. 11, n. 9, p. 1650-1663, 2011.

VOGEL-MIKUS, K., PONGRAC, P., KUMP, P., NECEMER, M.; REGVAR, M. Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. **Environmental Pollution**, Barking, v.139, p. 362-371, 2006.

WATANABE, S.; MIZOGUCHI, T.; AOKI, K.; KUBO, Y.; MORI, H.; IMANISHI, S.; YAMAZAKI, Y.; SHIBATA, D.; EZURA, H. Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 24, p. 33-38, 2007.

XU, C.; XU, Y.; HUANG, B. Protein Extraction for Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteomic Profiling in Turfgrass. **Crop Science**, Madison, v. 48, n. 4, p. 1608, 2008.

ZHAO, L.; SUN, Y.-L.; CUI, S.-X.; CHEN, M.; YANG, H.-M.; LIU, H.-M.; CHAI, T.-Y.; HUANG, F. Cd-induced changes in leaf proteome of the hyperaccumulator plant *Phytolacca americana*. **Chemosphere**, Oxford, v. 85, n. 1, p. 56-66, 2011.

ZHU, X.F.; ZHENG, C.; HU, Y.T.; Jiang, T'; LIU, Y.; DONG, N. Y.; YANG, J.L.; ZHENG, S.J. Cadmium-induced oxalate secretion from root apex is associated with cadmium exclusion and resistance in *Lycopersicon esulentum*. **Plant, Cell & Environment**, Oxford v. 34, n. 7, p. 1055-1064, 2011.