



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL
INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE – ITV
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA A AGROPECUÁRIA**

NAYARA MASTUB SOUZA

**PROTEÔMICA COMPARATIVA DE CUPUAÇUZEIROS SUBMETIDOS AO
DEFICIT HÍDRICO**

**BELÉM
2018**

NAYARA MASTUB SOUZA

**PROTEÔMICA COMPARATIVA DE CUPUAÇUZEIROS SUBMETIDOS AO
DEFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada a Universidade Federal Rural da
Amazônia, como parte das exigências do Curso de
Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária:
área de concentração Biotecnologia Aplicada ao
Metabolismo, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Marcelo Murad Magalhães

Coorientador: Dr. Roberto Lisboa Cunha

Coorientador: Dr. Rafael Moysés Alves

**BELÉM/PA
2018**

NAYARA MASTUB SOUZA

**PROTEÔMICA COMPARATIVA DE CUPUAÇUZEIROS SUBMETIDOS AO
DEFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada a Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária: Área de Concentração Biotecnologia Aplicada ao Metabolismo, para obtenção do título de Mestre.
Orientador: Dr. Marcelo Murad Magalhães

Aprovado em 30 de agosto de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcelo Murad Magalhães – Orientador
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

Prof. Dr. Hugo Alves Pinheiro – 1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto – 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Dr. Rafael Borges da Silva Valadares – 3º Examinador
INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE

Dr. Cláudio José Reis de Carvalho – Examinador Suplente
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Nazira Mastub e Valdemir Araújo, pelo amor, carinho e compreensão.
A minha tia e segunda mãe, Nilsa Koezuka, por toda dedicação, carinho e fé depositada.*

*Aos meus avós, Aldina Mastub, Nagib Mastub e Pedrina Araújo que não puderam
acompanhar essa conquista, mas sei que estariam orgulhosos.*

Ao meu noivo, Max Moura, por todo amor e apoio.

Aos meus amigos pelo companheirismo.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para essa vitória.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo amor incondicional, por trabalharem em dobro, sacrificarem seus sonhos em favor dos meus. Muito obrigada!

Aos meus tios e segundos pais, Nilsa Koezuka e Nelson Koezuka (*in memoriam*), que revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação e por cultivarem na criança todos os valores que me transformaram em um adulto responsável e consciente. Abriram a porta do meu futuro, iluminando meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar, o estudo.

Ao meu noivo, Max Moura, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo. Não foi só meu companheiro, mas amigo, mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes, você foi quem iluminou o caminho.

À Universidade Federal Rural da Amazônia, ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, a Embrapa Amazônia Oriental e ao Instituto Tecnológico da Vale pela oportunidade de realizar esse trabalho e contribuir para propagação de conhecimento.

Ao meu orientador, Dr. Marcelo Murad, pela orientação constante, dedicação e pelas lições de saber e de vida. Aos meus coorientadores, Dr. Roberto Lisboa pela dedicação e apoio e Dr. Rafael Alves pela doação das mudas e estrutura para o experimento. Ao Dr. Rafael Valadares por toda assistência e paciência durante esse trabalho. Ao amigo e coorientador de coração, Sidney Vasconcelos, por toda a ajuda e dedicação.

Ao Prof. Dr. Marcel Botelho, Prof^a. Dr^a. Ruth Bittencourt e Prof^a. Dr^a. Ana Sílvia Ribeiro, por tornarem essa conquista possível acreditando que eu seria capaz e confiando no meu trabalho, serei eternamente grata.

Aos amigos, Marina Ludmila, Fernanda Parente, Alinne Santos, Fagner Freires, Carlos Pimenta, Wanessa Amorim, Lígia Cristine, Rosane Chaves, Gleiciane dos Santos, Larissa Húrsula, Kelly Lisbôa, e Juscelino Palheta. Vocês foram força e inspiração!

Aos professores amigos, aos somente professores e aqueles que, mesmo com seus problemas, foram nossos amigos e professores, em especial Prof. Dr. Reginaldo Buselli, Prof. Dr. Hugo Pinheiro, Prof. Dr. Cândido Oliveira Neto, Prof. Dr. Rafael Viana e Prof. Dr. Lauro Itó.

Aos pesquisadores da Embrapa Amazônia Oriental, que mesmo com todos os seus afazeres, foram também amigos e professores, Dr. Cláudio Carvalho e Dr. Marcos Enê Oliveira, obrigada pelo apoio e ensinamentos.

A todos vocês, meu grande respeito, afeto e GRATIDÃO.

RESUMO

O déficit hídrico é o principal fator limitante na produtividade das culturas agrícolas. O plantio do cupuaçuzeiro vem sendo realizado em regiões com menores volumes pluviométricos na tentativa de prevenção a vassoura-de-bruxa. O objetivo desse trabalho foi obter o proteoma diferencial de progênies de *Theobroma grandiflorum* submetidas ao déficit hídrico e obter proteínas envolvidas no mecanismo de tolerância. O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Amazônia Oriental, foram utilizadas sete progênies de cupuaçuzeiro, originadas a partir de sementes de clones parentais do cultivar BRS Carimbó, as mudas foram cultivadas em sacos plásticos preenchidos com 8 kg de substrato. Durante o experimento as mudas foram dispostas no delineamento de blocos casualizados, no esquema fatorial 7 x 2 (progênies x regimes hídricos), com 5 repetições, totalizando 70 plantas. As plantas ficaram em crescimento e aclimatação por 8 meses, no oitavo mês, as plantas foram submetidas a dois regimes hídricos: um tratamento controle irrigado, e os tratamentos que sofreram suspensão total da irrigação por 16 dias. Subsequentemente, proteínas totais foram extraídas a partir de raízes das plantas de duas progênies contrastantes (57 e 1074) e os resultados demonstraram o acúmulo diferencial de proteínas envolvidas em vários metabolismos, com destaque para proteínas relacionados direta ou indiretamente à resposta a estresses e ao metabolismo energético. Proteínas abscisic stress-ripening protein 3-like, acidic endochitinase-like e cinnamyl alcohol dehydrogenase 1, relacionadas a resposta a estresse e proteínas como a aspartic proteinase relacionadas ao metabolismo energético apresentaram alto acúmulo em plantas da progênie 57 sob déficit hídrico. A progênie 1074 acumulou um menor número de proteínas de resposta a estresse e metabolismo energético. Os resultados obtidos no presente estudo fornecem informações sobre o mecanismo molecular da progênie 57, possivelmente mais tolerante ao déficit hídrico. São necessários estudos mais detalhados sobre os mecanismos moleculares relacionados às proteínas aqui identificadas que devem contribuir para a descoberta de marcadores moleculares ou bioquímicos a serem utilizados no melhoramento genético de cupuaçuzeiros.

Palavras-chaves: Cupuaçuzeiros. 2D-UPLC-MS^E. Proteômica. Déficit hídrico.

ABSTRACT

The water deficit is the main limiting factor in the productivity of agricultural crops. The planting of the cupuaçuzeiro has been carried out in regions with lower pluviometric volumes in an attempt to prevent the broom-witch. The objective of this work was to obtain the differential proteome of progenies of *Theobroma grandiflorum* submitted to water deficit and to obtain proteins involved in the mechanism of tolerance. The experiment was conducted in a greenhouse of Embrapa Amazônia Oriental, seven progenies of cupuaçuzeiro, originated from seeds of parental clones of cultivar BRS Carimbó, were grown in plastic bags filled with 8 kg of substrate. During the experiment the seedlings were arranged in a randomized complete block design, in the factorial scheme 7 x 2 (progenies x water regimes), with 5 replications, totaling 70 plants. The plants were under growth and acclimatization for 8 months, in the eighth month, the plants were submitted to two water regimes: an irrigated control treatment, and the treatments that underwent total suspension of the irrigation for 16 days. Subsequently, total proteins were extracted from plant roots of two contrasting progenies (57 and 1074) and the results demonstrated the differential accumulation of proteins involved in several metabolisms, especially proteins related directly or indirectly to the response to stress and metabolism energy. Abscisic stress-ripening protein 3-like, acidic endochitinase-like and cinnamyl alcohol dehydrogenase 1, related to stress response and proteins such as aspartic proteinase related to energy metabolism presented high accumulation in plants of the progeny 57 under water deficit. Progeny 1074 accumulated fewer proteins in response to stress and energy metabolism. The results obtained in the present study provide information on the molecular mechanism of progeny 57, possibly more tolerant to water deficit. More detailed studies are needed on the molecular mechanisms related to the proteins identified here that should contribute to the discovery of molecular or biochemical markers to be used in the genetic improvement of cupuaçu trees.

Key-words: Cupuaçuzeiros. 2D-UPLC-MS^E. Proteomics. Water deficit.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	8
1.1 Revisão de Literatura	10
1.1.1 Aspectos gerais da cultura do cupuaçuzeiro	10
1.1.2 Deficit hídrico	12
1.1.3 Proteômica	14
2. PROTEÔMICA COMPARATIVA DE CUPUAÇUZEIROS SUBMETIDOS AO DEFICIT HÍDRICO	18
2.1 Introdução	18
2.2 Material e Métodos	20
2.2.1 Material vegetal	20
2.2.2 Extração e quantificação de proteínas	23
2.2.3 Digestão de proteínas	23
2.2.4 Dessalinização das amostras	24
2.2.5 Fracionamento das proteínas (2D-UPLC-MS ^E)	24
2.2.6 Bioinformática e estatística	25
2.3 Resultados	26
2.3.1 Acúmulo de proteínas	26
2.3.2 Acúmulo diferencial de proteínas	28
2.3.3 Anotação funcional das proteínas	28
2.3.3.1 Resposta a estresse	29
2.3.3.2 Metabolismo energético	32
2.4 Discussão	36
2.4.1 Proteínas de resposta a estresse	36
2.4.2 Proteínas do metabolismo energético	40
2.4.3 Agrupamento hierárquico	44
2.5 Conclusão	45
REFERÊNCIAS	46

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) é uma frutífera dispersa por toda a bacia amazônica, sendo esta região a única reserva de variabilidade genética nativa da espécie (ALVES et al., 2012). O cupuaçu apresenta excelentes qualidades nutricionais em suas sementes e polpa, elevados teores de óleo, cujo valor econômico torna a exploração dessa espécie uma atividade altamente rentável. (ARAÚJO et al., 2002).

O cultivo do cupuaçuzeiro em escala comercial é bastante recente. Porém, desde os tempos pré-colombianos, essa espécie era cultivada pelas populações indígenas amazônicas. A cultura começou a ter expressão econômica a partir da década de 1970, quando foi utilizada para ocupar áreas de pimenteiros-do-reino que estavam sendo dizimadas pela fusariose. Neste período a produção de frutos era proveniente de pequenos plantios em quintais agroflorestais e de populações nativas existentes no sudeste do Pará e noroeste do Maranhão (ALVES; FERREIRA, 2012). Concomitante, ocorreu um grande aumento na utilização industrial do produto nos arredores de Belém, onde muitas indústrias processam o fruto e seus subprodutos destinados ao mercado interno e externo (CALZAVARA et al., 1984).

Atualmente, a maior produção de cupuaçu provém de plantios racionais estimados em mais de 20 mil hectares distribuídos nos estados do Pará, Rondônia, Amazonas e Acre, principalmente. No estado do Pará existem mais de 14 mil hectares plantados, dos quais 5 mil estão em produção (HOMMA, 2014). A quantidade de cupuaçu produzida no Brasil em 2017 foi de 798 toneladas, sendo 343 toneladas somente no estado do Pará (IBGE, 2018). Uma maior produção de frutos pode ser conseguida com o emprego de técnicas de melhoramento genético (ARAÚJO et al., 2002).

No entanto, a cultura apresenta alguns entraves, tais como a baixa disponibilidade hídrica que afeta negativamente o crescimento dos cultivos agrícolas, atuando como principal causa da redução da produtividade (PIMENTEL, 2004).

A resposta à seca é uma característica complexa, afetada por vários fatores, incluindo o meio ambiente, genótipo, estágio de desenvolvimento, intensidade e duração de estresse (LATA et al., 2015).

As plantas, em condições de déficit hídrico, apresentam como um dos primeiros efeitos biofísicos significativos a redução na turgescência da célula e alterações nos processos fisiológicos dependentes do turgor, como o crescimento celular (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Devido ao aumento da severidade do déficit hídrico, a fotossíntese e a transpiração são afetadas, principalmente, como consequência do fechamento dos estômatos e do bloqueio da difusão de dióxido de carbono (CO₂) (KUMAR et al., 1994). Plantas sob déficit hídrico também apresentam a redução da concentração de clorofila em função da degradação de membranas causada pelo estresse oxidativo em espécies menos tolerantes à seca (MORAN et al., 1994).

Segundo Roveda-Hoyos e Fonseca-Moreno (2011), as plantas respondem a deficiência hídrica por meio de alterações em vários processos a nível fisiológico, celular e molecular, que podem contribuir para a tolerância ao estresse. Ainda, segundo Roveda-Hoyos e Fonseca-Moreno (2011), é possível classificar os genes relacionados ao estresse hídrico em dois grupos: o primeiro grupo codifica as proteínas que provavelmente funcionam, via mecanismos de tolerância ao estresse abiótico como salino, hídrico, e de temperatura. Alguns exemplos de proteínas envolvidas são as proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA) e proteínas de choque térmico (HSP), proteínas antifreeze (AFP), que atuam como acompanhantes de proteínas envolvidas no transporte de água, íons e outros compostos, além das enzimas envolvidas na biossíntese de aminas e poliaminas (glicinabetaina), enzimas de desintoxicação, osmólitos (manitol, trealose, galactinol e rafinose) e aminoácidos (prolina) (TIMPERIO et al., 2008). O segundo grupo de genes induzidos pelo estresse hídrico possibilita a expressão de proteínas envolvidas nas vias de transdução de sinal mediadas por ácido abscísico (ABA), incluindo proteínas fosfato, proteínas quinases, fosfolípidos e outras moléculas, como proteínas ligadas ao cálcio e peróxido de hidrogênio (UMEZAWA et al., 2006).

Devido à grande variabilidade natural disponível no cupuaçu, a primeira estratégia de melhoramento foi selecionar diretamente genótipos de populações espontâneas, semiespontâneas ou de plantios comerciais heterogêneos. Em um período de 15 anos foi desenvolvida uma nova cultivar de cupuaçu com uma estrutura genética advinda de uma população melhorada, a cultivar BRS Carimbó, propagada por sementes e composta de distintos materiais que apresentam fontes diferentes de resistência e aptidão para produção de polpa e sementes (ALVES e FERREIRA, 2012).

O cultivo do cupuaçuzeiro na região Norte vem sendo implementado em locais de baixos índices pluviométricos, com o propósito de prevenir o surgimento de doenças. No entanto, são necessários estudos sobre o comportamento fisiológico e bioquímico dessa

espécie sob condições de déficit hídrico, considerando que nessas áreas é comum a ocorrência de períodos secos bem definidos com aproximadamente seis meses de pluviosidade abaixo de 100 mm (FERNANDES, 2016). Existe uma carência de informação científica de genótipos de cupuaçu em condições de déficit hídrico.

Assim, o objetivo desse trabalho foi obter o proteoma diferencial para fazer um estudo comparativo envolvendo mudas de genótipos de *Theobroma grandiflorum*, utilizando progênies com possíveis diferenças nos níveis de tolerância ao déficit hídrico submetidos a dois regimes hídricos. Espera-se identificar proteínas envolvidas em mecanismos de tolerância, com potencial para serem utilizadas como marcadores bioquímicos e/ou moleculares na seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico.

1.1. Revisão de Literatura

1.1.1 Aspectos gerais da cultura do cupuaçuzeiro

Pertencente a família Malvaceae, o cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.), possui ampla ocorrência na região Norte e parte do Nordeste brasileiro (CALZAVARA et al., 1984). É uma fruteira de grande importância para a região Amazônica, podendo ser encontrada nas áreas de mata do Sul e Noroeste da Amazônia oriental brasileira, Nordeste do Maranhão e na região Amazônica dos países vizinhos (COSTA et al, 2003).

Segundo Souza et al. (1999) o cupuaçuzeiro é uma árvore com sistema radicular pivotante e nos primeiros 20 a 25 cm de profundidade do solo desenvolve grande quantidade de raízes laterais ou secundárias. As folhas do cupuaçuzeiro são inteiras, de coloração rósea e coberta de pêlos quando jovens e verde quando maduras, tendo de 25 a 30 cm de comprimento por 10 a 15 cm de largura. As flores são as maiores do gênero e crescem nos ramos, pétalas de coloração branca ou vermelha com tonalidade variável de clara a escura se desenvolvem nos ramos mais periféricos, sendo uma espécie de polinização cruzada (alógama), com possibilidades de autofecundação. É uma espécie diplóide, membro da família *malvaceae* é comumente relacionado ao cacau (*Theobroma cacao* L.). O cupuaçuzeiro

é considerado uma espécie tricômica, com ramos que se dividem em três, que posteriormente crescerão em paralelismo com o solo. Da axila dos galhos emerge um broto que retoma o crescimento vertical (SOUZA et al., 2011).

Possui fruto na forma de baga com um pó ferrugíneo sobre a casca medindo em média 23 cm de comprimento, apresenta polpa de aroma agradável e sabor azedo que representa, em média, 48% do peso do fruto, suas sementes são ricas em gordura e proteína, onde cada semente tem em média 5 cm de comprimento. A cultura pode ser percebida em vários tipos de ambientes, tanto no silvestre (encontrado no meio da floresta), nos quintais ou em plantios comerciais (DE ALMEIDA et al., 2012). O cupuçuzeiro pode atingir uma altura de até 15 metros, com 6 a 8 metros de diâmetro de copa é uma espécie bem adaptada ao sombreamento, apresentando assim condições para o consorcio com outras espécies frutíferas ou madeiráveis, sem provocar danos ambientais, para características restauradoras e conservadoras (GONDIM et al., 2001). O consorcio do cupuçuzeiro com outras espécies é indicada como a alternativa mais apropriada para o uso da terra a fim de diminuir os danos ecológicos, além de contribuir na qualidade de vida do pequeno agricultor da Amazônia (HOMMA, 2001; SILVA et al., 2007; SAID, 2011).

O cupuaçu pode ser comercializado diretamente do produtor ao intermediário, também pode ser vendido aos comércios, ou consumidores finais (hotéis, restaurantes, sorveterias, lanchonetes, o consumidor caseiro que adquire polpa congelada ou fruto para o preparo, em sua residência, de sucos, doces entre outros) alcançando uma variedade de preços. (SOUZA et al., 2011). O consumidor do cupuaçu ainda é predominantemente regional, indicando a necessidade de estruturas que facilitem a oferta do produto em maior escala no mercado tanto nacional como internacional (MARTIM, 2013).

A cultura é propícia a algumas doenças, sendo a principal delas a vassoura-de-bruxa (*Crynipelis perniciosus*), doença que está presente em toda a região norte do país, causando grandes danos econômicos na produção. Está presente tanto em mudas como em plantas adultas atacando os tecidos meristemáticos em crescimento, flores e os frutos (ALVES et al., 1998; SOUZA, 2007). Em 2014, para o estado do Amazonas, foram lançadas cinco cultivares clonais de cupuçuzeiros (BRS 297, BRS 298, BRS 299, BRS 311, BRS 312) que aliam produtividade e resistência vassoura-de-bruxa. Esses clones foram obtidos pelo método de melhoramento de seleção clonal da Embrapa Amazônia Oriental e a produtividade dos frutos desses materiais varia de 7 a 10,1 toneladas por hectare e uma resistência a vassoura-de-bruxa

acima de 85%, contribuindo para a redução no custo de manejo da doença. (SOUZA et al., 2014)

Na tentativa de prevenção a vassoura-de-bruxa, nos últimos anos, o plantio do cupuaçuzeiro no Estado do Pará vem sendo realizado em regiões com menores volumes pluviométricos, porém, há poucos estudos sobre as respostas metabólicas dessa cultura em condições de déficit hídrico.

1.1.2 Déficit hídrico

Segundo Fan et al. (2006), o déficit hídrico em consequência da seca é estabelecido quando a absorção de água pelo sistema radicular não consegue atender as exigências da planta e entre as principais exigências estão a fotossíntese e a transpiração das partes aéreas, dois processos essenciais ao crescimento vegetal. Um dos principais fatores abióticos limitantes da produção agrícola mundial é a baixa disponibilidade hídrica, pois causa interferência no mecanismo de absorção e assimilação de água e nutrientes pelas plantas, gerando alterações metabólicas negativas (HAMDY et al., 2003; LECHINOSKI et al., 2007; ZANETTI et al., 2016).

Plantas sob déficit hídrico diminuem sua condutância estomática levando a uma diminuição na C_i (concentração interna do CO_2) e na transpiração, tendo como consequência uma diminuição no suprimento de CO_2 para a fotossíntese (OLIVEIRA et al., 2005). Observa-se também o ajustamento osmótico para que a planta se aclimate ao déficit hídrico, podendo acumular prolina (ALVARENGA et al., 2011) e outros aminoácidos livres (KUSAKA et al., 2005), poliálcoois (RAMANJULU e BARTELS, 2002) e carboidratos (PEREIRA et al., 2012). Além dos carboidratos, por muito tempo se correlaciona a capacidade de prolina com a tolerância ao estresse (SOMAL e YAPA, 1998). A literatura comprova que a prolina em sua forma livre se acumula, não só em resposta à baixa disponibilidade de água, como também por efeitos da salinidade e baixas temperaturas. Esse acúmulo vem sendo observado em tecidos e órgãos vegetais, como folhas maduras (NOGUEIRA et al., 2001), folhas destacadas (MAIA et al., 2007), folhas em crescimento (MONTEIRO et al., 2014) e na seiva do floema (NOGUEIRA et al., 2001). Porém, não só os carboidratos e a prolina refletem danos as

plantas, o estresse por déficit hídrico gera espécies reativas de oxigênio (ROS), os quais desencadeiam processos de peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (SMIRNOFF, 1993; SCHWANZ e POLLE, 2001).

O crescimento das plantas (expansão e tamanho das folhas, índice de área foliar, altura de plantas, crescimento das plantas e número de plantas) foi reduzido quando o déficit hídrico foi imposto durante os estágios de crescimento vegetativo (FAROOQ et al., 2009). Sob severo déficit hídrico, as plantas senescem suas folhas para reduzir a taxa de transpiração e o consumo de água (AGUSTI et al., 2012, MUCHOW, 1986). Durante o déficit hídrico ocorre a diminuição da taxa fotossintética e a quantidade de assimilados disponíveis para distribuição para os órgãos drenos é reduzida (KIM, 2000; HUBER, 1984).

Em um estudo realizado por Texeira (2018), foi aplicado o déficit hídrico em sete progênies de cupuaçuzeiros e todas apresentaram redução na concentração de nitrato, amido e atividade da glutamina sintetase nos tecidos foliares e radiculares, e aumento nas concentrações de amônio, aminoácidos solúveis totais, proteínas solúvel totais, prolina, glicina betaína, carboidratos solúveis totais, sacarose e açúcares redutores e não redutores.

A tolerância à seca é uma característica das plantas que são capazes de resistir melhor a menor disponibilidade hídrica, por demonstrarem maior capacidade de obtenção da água, ou maior eficiência no uso da água disponível (TAIZ e ZEIGER, 2004). Várias pesquisas têm se voltado para a elucidação dos mecanismos fisiológicos e genéticos relacionados à resistência ou tolerância à seca, com a identificação de genes importantes na determinação destas características. As reações moleculares ao estresse hídrico, em plantas, têm sido amplamente analisadas estudando diversos genes de resposta à seca, alta salinidade e frio em nível transcricional (GOLDACK et al., 2011; HUANG et al., 2012) indicando a complexa interação entre estes genes (BENKO-ISEPPON et al., 2011). As plantas podem ainda desenvolver, a nível de expressão gênica, respostas ao estresse hídrico relacionadas com a produção de enzimas chaves na via de síntese de substâncias osmóticas, enzimas antioxidantes, proteínas com função protetora, fatores de transcrição e outras proteínas envolvidas em respostas do estresse hídrico (BRAY, 1997; ZHU et al., 2002). Alguns dos genes induzidos pela seca são comuns àqueles induzidos por outros tipos de estresse abiótico como salinidade e baixas temperaturas; muitos destes genes respondem ao ABA, outros não (QURESHI et al., 2007).

Os genes induzidos em condições de estresse tem sua função tanto como protetores diretos ou de reguladores de expressão de outros genes envolvidos na transdução de sinais em

resposta ao estresse (KALEFETOĞLU e EKMEKCI, 2005). O primeiro grupo contém proteínas como aquaporinas, proteínas necessárias para produção de vários osmoprotetores (açúcar, prolina, glicina, betaína, etc.), proteínas que protegem macromoléculas e membranas, proteínas LEA, chaperonas, proteínas ligadoras de mRNA, proteases, e enzimas de detoxificação. O segundo grupo contém proteínas envolvidas na regulação da via de transdução de sinal, expressão gênica (ativação e inativação), como as proteínas cinases, fatores transcricionais, fosfolipases C e proteínas de biossíntese de ABA (UMEZAWA, 2004; KALEFETOĞLU e EKMEKCI, 2005). As análises do perfil de proteínas das plantas em condições de estresse permitem identificar proteínas importantes relacionadas direta ou indiretamente ligadas a estas respostas.

O estudo da proteômica possibilita o entendimento de processos biológicos dinâmicos com a análise sistemática do perfil proteico expresso sob determinada condição em um organismo, e ainda o mapeamento de vias metabólicas e identificação de genes alvos que podem ser usados na manipulação genética (PANDEY e MANN, 2000; PATTERSON e AEBERSOLD, 2003). Um enfoque muito importante nos estudos relacionados à tolerância ao déficit hídrico é a avaliação do nível da tolerância de genótipos diferentes. Com isso a proteômica pode detectar a expressão de proteínas diferenciais ligadas a mecanismos de tolerância à seca e ajudar a elucidar os mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos.

1.1.3 Proteômica

As proteínas representam a maquinaria bioquímica e os processos funcionais de como um organismo responde as mudanças ambientais. Há algum tempo, a proteômica apresenta uma abordagem eficaz para demonstrar como as proteínas se comportam durante essas mudanças e, portanto, como os organismos se adaptam a vários ambientes abióticos (TOMANEK, 2014).

A proteômica por espectrometria de massa é considerada uma tecnologia indispensável para interpretar a informação codificada no genoma. Por se tratar de uma técnica multifacetada e em rápido desenvolvimento, cada inovação permite uma melhora na qualidade dos resultados e expande a gama de potenciais aplicações para a biologia molecular

e celular. É uma técnica utilizada no estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas (AEBERSOLD e MANN, 2003). A proteômica em plantas possui várias abordagens, podendo ser descritiva, comparativa, pós traducionais e interatômicas, sendo utilizada para a melhoria da saúde por meio do aumento da produção agrícola e oferta de alimentos, fibras e combustíveis, favorecendo o crescimento econômico, sustentabilidade ambiental e o bem estar humano. (JORRÍN-NOVO et al., 2015).

Entre vários trabalhos realizados sobre análises de expressão diferencial de proteomas de resposta a estresses em vegetais nos últimos 15 anos (JORRIN-NOVO et al., 2009), ressalta-se as análises em plantas submetidas a estresse abiótico por seca (RABELLO et al., 2008), baixa temperatura (LEE et al., 2008), salinidade (CHENG et al., 2009, ABREU et al., 2014), ozônio (CHO et al., 2008), alta temperatura (XU e HUANG, 2010) e estresse oxidativo (WAN et al., 2008). Para um genótipo mais produtivo, a capacidade de sintetizar uma variedade de proteínas diferencialmente acumuladas em resposta à disponibilidade de água parece ser uma característica chave na manutenção do crescimento da biomassa durante o período de déficit. A estratégia vegetal pode envolver uma diminuição da atividade fotossintética durante a diminuição da água associada à realocação de recursos por grandes mudanças na expressão de genes associados ao metabolismo primário (VILLAR et al., 2011).

Vários artigos vêm sendo publicados sobre proteômica do estresse hídrico em diferentes espécies vegetais: feijão comum (ZADRAŽNIK et al., 2013); trigo (PENG et al., 2009); arroz (KE et al., 2009); e milho (ALVAREZ et al., 2008). Todos estes estudos formam conteúdos específicos da proteômica em plantas e têm permitido identificar as proteínas que desempenham funções importantes diretamente em resposta a esses estresses abióticos nos vegetais, na regulação gênica dependente de estresses ou como enzima chave na biossíntese de moléculas anti-estresses como osmoprotetores e as fitoquelatinas (QURESHI et al., 2007). Com isso, mudanças específicas no perfil de proteínas possibilitam a identificação e caracterização funcional das proteínas diferencialmente acumuladas e cujas funções biológicas estão relacionadas com a tolerância (BENEVENTI, 2010), contribuindo com o entendimento dos mecanismos moleculares que induzem as respostas ao estresse (GONZÁLEZ et al., 2010; JORRÍN-NOVO et al., 2009; SOARES, 2013).

Para lidar com o déficit hídrico, as plantas ativam alguns mecanismo que permitem fugir do déficit como um ciclo de vida mais rápido, demonstram resistência por meios como aprofundamento de raízes, impermeabilização das folhas e fechamento estomático, assim

como podem tolerar a seca por meio de ajustamento osmótico, fechamento dos estômatos e indução de antioxidantes (LEVITT, 1980; BRAY, 2000). Devido a mecanismos como o fechamento estomático, surge uma limitação fotossintética que aumenta a relação NADPH/NADP⁺, podendo levar a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio causando danos oxidativos (FORYER e NOCTOR, 2000).

Cao et al. (2017) demonstraram em um trabalho de proteômica com raízes de pessegueiros (*Amygdalus mira*) submetidos ao déficit hídrico durante 15 dias, que do total de 95 proteínas identificadas na planta, 26,31% eram de proteínas relacionadas à estresse e defesa, 18,95% de transcrição e tradução e que essas proteínas desempenham um papel importante na resposta à seca.

Ghatak et al. (2016), fizeram um estudo proteômico em diversos tecidos de milho (*Pennisetum glaucum*) submetidos ao déficit hídrico, e identificaram um aumento no acúmulo de proteínas relacionadas a mecanismo de sinalização e resposta a estresse, proteínas de síntese e degradação de proteínas, proteínas de danos oxidativos e proteínas de choque térmico. Foi destacado o aumento no acúmulo de proteínas como peroxidases, proteínas tipo germinativa (GLP5), anexina e proteínas de choque térmico (Hsp 70). Estas proteínas estão ativamente envolvidas na defesa contra patógenos e no ajuste do balanço hídrico.

Zang e Shi (2018), avaliaram as respostas fisiológicas e proteômicas de duas variedades de alfafa (*Medicago sativa L.*) com níveis diferentes de tolerância à seca, Longzhong (tolerante à seca) e Gannong N^o.3 (sensível à seca), as plantas foram submetidas a tratamentos com polietilenoglicol (PEG-6000) e os resultados mostraram que níveis de prolina, malondialdeído (MDA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical livre hidroxila (OH•) e radical livre ânion superóxido (O₂•⁻) em ambas as variedades foram significativamente aumentados, enquanto a atividade radicular, atividades da superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR), e as taxas de ascorbato reduzido/oxidado (AsA/DHA) e glutathione reduzida/oxidada (GSH/GSSG) foram significativamente diminuídas. Os teores de proteína solúvel e açúcar solúvel, a capacidade antioxidante total (T-AOC) e as atividades da peroxidase (POD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) aumentaram no início e depois diminuíram com o aumento nos dias de tratamento. Sob estresse, Longzhong mostrou níveis mais baixos de MDA, H₂O₂, OH• e O₂•⁻, porém níveis mais altos de SOD, CAT, APX, T-AOC e maiores razões de AsA/DHA e GSH/GSSG em comparação com Gannong N^o.3. Foram identificadas proteínas diferencialmente acumuladas nas duas variedades de alfafa, a

maioria dessas proteínas foram relacionadas à resposta a estresse e defesa, metabolismo de proteínas, transporte transmembrana, proteínas de sinalização, bem como metabolismo da parede celular e do citoesqueleto. Assim, eles atribuíram que a maior capacidade de tolerância à seca da variedade Longzhong se deve à sua maior capacidade de ajuste osmótico, maior capacidade de orquestrar seus sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, evitando grandes danos oxidativos em comparação com a variedade Gannong N^o.3. Também relataram alguns mecanismos e vias importantes que conferiam essa tolerância como metabolismo de carboidratos, desintoxicação de ROS, metabolismo secundário, processamento de proteína, transporte de íons e água, transdução de sinal e ajuste da parede celular.

Assim, tendo em vista a necessidade do plantio de cupuaçuzeiros em locais com menores volumes de chuva, a seleção de genótipos com características de tolerância a seca é de grande importância para a manutenção da produção. Nesse contexto, estima-se que a proteômica pode auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares de tolerância por meio da identificação de proteínas diferencialmente acumuladas sob condições de déficit hídrico e servir de base para trabalhos futuros de melhoramento genético da espécie.

2. PROTEÔMICA COMPARATIVA DE CUPUAÇUZEIROS SUBMETIDOS AO DEFICIT HÍDRICO

2.1. Introdução

O cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Wilidenow ex Sprengel) Schumann] é uma espécie nativa da região amazônica e pertence à família Malvaceae, uma espécie frutífera arbórea que mostra-se como uma das fruteiras mais importantes para o desenvolvimento da agricultura na Amazônia Brasileira. A polpa é utilizada na fabricação de doces, sorvete, sucos, etc. (VENTURIERI, 1993; FERREIRA et al., 2009). Sua altura pode variar entre 15 e 20 metros. Quando cultivada, seu porte é reduzido devido a podas constantes (CARVALHO, 2004). O caule possui fissuras e casca marrom escura, as folhas jovens são de cor rósea e quando adultas são de cor verde escura e sua inflorescência pode ser axilar ou extra axilar (VENTURIERI et al., 1993).

Com a mudança climática e eventos climáticos atípicos, é mais provável que ocorram períodos de secas mais frequentes e outros estresses como calor e salinidade em todo o mundo (NAKASHIMA et al., 2014; PARK et al., 2015; WANG et al., 2003). A partir de suas características intrínsecas, o cupuaçuzeiro encontra dificuldade para se estabelecer em locais que apresentem elevada deficiência hídrica, especialmente nos primeiros anos de implantação, já que seu habitat são as florestas de terra firme (ALVES et al., 1999).

O estresse causado pela seca reduz o crescimento das plantas e a produção agrícola (BRAY et al., 2000; FANG & XIONG, 2015). Entre os fatores abióticos, a água é o mais limitante para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas (PAIVA et al., 2005), pois afeta as relações hídricas, alterando a fisiologia e o metabolismo das plantas, causando grandes perdas na produtividade agrônômica e florestal (FLEXAS et al., 2002). O déficit hídrico induz uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas (OSAKABE et al., 2014).

O déficit hídrico induz o fechamento estomático, conseqüentemente, diminui a taxa fotossintética e a transpiração (CHAVES et al., 2003; HARB e SAMARAH 2015; MANSFIELD e ATKINSON, 1990). A bioquímica da fotossíntese também é inibida pela seca (LAWLOR e CORNIC, 2002; SIGNARBIEUX e FELLER, 2011).

As plantas superiores desenvolveram uma série de mecanismos de adaptação a

deficiência de umidade do solo, sendo as estratégias de tolerância uma das mais importantes. O conhecimento de como as plantas utilizam a água do solo e de como respondem aos níveis de armazenamento a partir do balanço hídrico pode ser uma saída viável para o estabelecimento de estratégias eficazes de manejo, visando o melhor uso possível das reservas de água do solo pelas culturas (CUSTÓDIO et. al., 2003).

Em uma pesquisa (ALVES et al., 1999) que avaliou o comportamento inicial de 33 clones de cupuaçu em capoeira, foi observado que em áreas de deficiência hídrica acentuada as cultivares de cupuaçu cultivadas em capoeira apresentaram redução de mortalidade, por oferecerem maior proteção quanto a evaporação.

O déficit hídrico afetou a taxa fotossintética, condutância estomática e conteúdo relativo de água em um estudo ecofisiológico e bioquímico do cupuaçuzeiro (OLIVEIRA-NETO, 2005). Porém, a concentração de carboidratos solúveis totais não foi alterado pelo déficit hídrico, já os teores de proteínas solúveis totais apresentaram uma redução significativa. Após a reidratação, o cupuaçuzeiro recuperou os níveis de conteúdo relativo de água, a taxa fotossintética, a condutância estomática e a concentração de proteínas solúveis totais, porém essa reidratação não foi efetiva sobre a concentração de carboidratos solúveis totais.

A seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico pode ser feita por meio do conhecimento das repostas moleculares acessados por meio de estudos proteômicos comparativos entre genótipos tolerantes e suscetíveis ao estresse para identificar possíveis alterações envolvidas em expressões diferenciadas de proteínas.

A proteômica é o conceito dado à análise sistemática, em larga escala, que visa identificar proteínas expressas em um determinado período biológico, seja pela abundância, atividade, modificações pós-traducionais ou pela interação entre as proteínas (WRIGHT et al., 2012). Segundo Silva et al. (2007), o proteoma de um organismo, ao contrário do genoma, não é estático e pode se modificar dependendo das condições e estímulos a que este organismo está exposto. Sendo assim, o proteoma reflete a expressão das moléculas que influenciam, mais diretamente, a bioquímica e o funcionamento celular.

Em pesquisa realizada com de cana-de-açúcar para identificação de peptídeos produzidos diferencialmente em resposta potencial ao déficit hídrico (RIBEIRO, 2010), foram utilizados dois híbridos comerciais, o RB867515 (tolerante à seca) e o RB72454 (sensível à seca). Através de análise proteômica foram identificadas várias proteínas associadas a mecanismos de resposta ao déficit hídrico, entre elas: proteínas associadas à regulação da

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

Usar a biotecnologia para compreender as respostas das plantas à seca nos níveis morfológicos, fisiológicos e moleculares e como essas mudanças contribuem com a tolerância ao déficit hídrico sobre a produtividade das mesmas é necessário para melhorar a manutenção do rendimento e a qualidade da cultura (BENESOVA et al., 2012, OSAKABE et al., 2014). O estudo e caracterização dessas proteínas é de grande importância para determinar o quanto cada uma delas, individualmente ou em conjunto, contribuem para a tolerância ao estresse por déficit hídrico, servindo assim para estudos de melhoramento genético e desenvolvimento de marcadores para seleção de genótipos tolerantes ao déficit hídrico.

Tendo isso posto hipotetizamos que o acúmulo diferencial de proteínas pode estar relacionado a promoção de maior tolerância em uma progênie de cupuaçuzeiro quando submetido ao déficit hídrico. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o acúmulo diferencial de proteínas em raízes de duas progênies de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum*, sendo uma tolerante e outra sensível ao déficit hídrico.

2.2. Material e Métodos

2.2.1 Material Vegetal

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Amazônia Oriental, localizada no município de Belém, PA (1° 26' 24 latitude sul, 48° 26' 43 longitude oeste). Foram utilizadas sete progênies de cupuaçuzeiro, originadas a partir de sementes de clones parentais do cultivar BRS Carimbó (Tabela 1).

Tabela 1 – Origem dos clones das progênies avaliadas, suas procedências e respectivas ancestralidade.

Clone	Origem da mãe	Origem do pai	Ancestralidade
32	174; Coari - AM	186: Codajás - AM	174 x 186
42	186: Codajás - AM	434: Muaná - PA	186 x 434
46	186: Codajás - AM	215: Manacapuru - AM	186 x 215
47	186: Codajás - AM	1074: Itacoatiara - AM	186 x 1074
57	186: Codajás - AM	513: Oiapoque - AP	186 x 513
215	215: Manacapuru - AM	-	Primária
1074	1074: Parintins - AM	-	Primária

Fonte: Embrapa Amazônia Oriental, 2016.

As sementes utilizadas para o preparo das mudas foram retiradas de frutos maduros, cujo plantio originário fica localizado no pomar experimental da Embrapa Amazônia Oriental, no município de Tomé Açu – PA. Foram colhidos dois frutos de cada uma das progênies, de onde as sementes foram retiradas, despulpadas manualmente, e logo após foi realizada a semeadura em sementeira, tendo como substrato apenas serragem curtida.

Vinte e dois dias após a semeadura, as plântulas ainda sem folhas foram transplantadas para sacos de polipropileno de 20 x 45 cm, preenchidos com 8 kg de substrato preparado através de mistura do solo com esterco (cama de aviário), na proporção de 3:1(V/V), respectivamente.

Após o transplante, as mudas foram dispostas de maneira a comporem o delineamento estatístico de blocos casualizados, no esquema fatorial 7 x 2 (progênies x regimes hídricos), com cinco repetições, totalizando 70 plantas. As plantas foram mantidas em casa de vegetação por oito meses, sendo que nos primeiros dois meses a irrigação ocorreu por microaspersão diária de 30 minutos, com vazão de 40 Lh⁻¹. Após este período, a irrigação passou a ser realizada manualmente, com aplicação diária de 300 mL de água por muda, para manter a umidade do solo próximo à capacidade de campo.

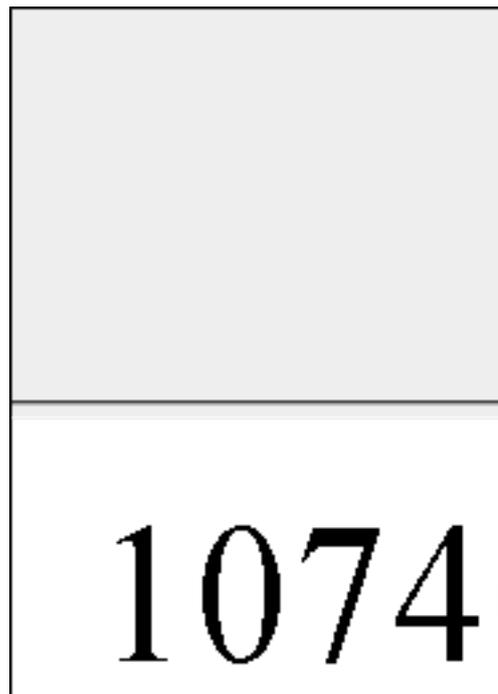
No oitavo mês, as plantas foram submetidas a dois regimes hídricos: um tratamento controle, onde as plantas permaneceram com irrigação de 300 mL/dia, e os tratamentos que sofreram suspensão da irrigação por 16 dias. De acordo com o demonstrado no croqui (Figura 1), cada bloco possui 7 progênies e 2 plantas por genótipo. Uma destas plantas foi utilizada como controle (C) e corresponde ao tratamento próximo da capacidade de campo, ou seja, não sofreu déficit hídrico. Já a outra planta do mesmo genótipo sofreu déficit hídrico, com a suspensão da irrigação por 16 dias seguidos.

Não houve bordadura no experimento, no entanto, os vasos foram constantemente dispostos em diferentes posições dentro de cada bloco ao longo do tempo. Assim, o croqui apresentado ilustra o início do experimento. Todas as plantas permaneceram dentro do seu bloco inicial, e foram somente dispostas em posições diferentes ao longo do tempo com a intenção de diminuir o efeito bordadura.

Do total de sete progênies submetidos a deficiência hídrica, todos apresentaram murchamento foliar e perda de vigor. A progênie que apresentou os menores sintomas visuais ao deficit hídrico foi selecionada como sendo a mais tolerante (progênie 57). A que apresentou graves sintomas visuais relacionados ao deficit hídrico foi selecionada como sendo a menos tolerante (progênie 1074).

Foram coletadas amostras de raízes das duas progênies mais contrastantes. As amostras de raízes de cinco plantas, uma de cada bloco para cada condição, foram homogeneizadas para formar um *pool* com o objetivo de eliminar o efeito do genótipo. Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para serem usadas para o preparo dos extratos proteicos.

Figura 1 – Croqui com 7 progênies dispostos em blocos casualizados em esquema fatorial 7x2. (C= controle)



Fonte: A autora, 2016.

2.2.2 Extração e quantificação de proteínas

As proteínas foram isoladas de acordo com protocolo proposto por Wang (2006), as amostras contendo raízes de cupuaçuzeiros foram maceradas com auxílio de pistilo em almofariz contendo nitrogênio líquido até a formação de um pó fino, adicionou-se em cada amostra 10 mL de solução tampão contendo sacarose (1,5 M), Tris-HCL (1 M, pH 8), SDS (dodecilsulfato de sódio, 10%), PMSF (fluoreto de metilfenilsulfonil, 100 mM), PVPP (polivinilpolipirrolidona) e H₂O ultra pura. Foram adicionados também 100 µL de inibidor de proteases (Protease Inhibitor cocktail - P8340 Sigma-Aldrich) e 500 µL de β-mercaptoetanol. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos, depois foram agitadas em sonicador por aproximadamente 30 segundos, repetindo esse processo por 5 vezes. Logo após, foi feita a separação dos extratos em dez microtubos cada e adicionou-se 700 µL de fenol por microtubo.

As amostras foram então centrifugadas a 14.000 rpm por 8 minutos, para separação da fase fenólica, que foi transferida, e as amostras centrifugadas novamente a 14.000 rpm por 8 minutos para eliminação de qualquer resíduo de SDS ou da fase aquosa. Após centrifugação, adicionou-se 1.300 µL de acetato de amônia 0,1 M preparado em metanol. Os microtubos foram mantidos a -80°C para precipitação *overnight* das proteínas. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 8 minutos, após centrifugação foi descartado o sobrenadante. O *pellet* foi transferido para um novo microtubo e lavado quatro vezes com acetona 80 %. Posteriormente foi realizada uma última lavagem com etanol 70 % e o *pellet* foi seco em concentrador a vácuo por aproximadamente 7 minutos a temperatura ambiente. Os extratos foram resuspendidos em tampão de solubilização composto de 200 µL de tampão de uréia (7 mol.L⁻¹) e tiouréia (2 mol.L⁻¹). As quantificações das amostras de proteínas foram realizadas no Qubit 2.0 (Invitrogen).

2.2.3 Digestão de proteínas

A digestão de proteínas foi realizada com tripsina (20 ng/µL), utilizou-se alíquotas das amostras contendo 50 µg de proteína, completadas com uréia 8 M para um volume final de 150 µL cada. Para a redução dos grupos sulfidrilas foi aplicado 3 µL de ditioneitol (DTT) 0,5 M, incubando as amostras por 25 minutos a 56°C, adicionou-se 8,48 µL iodoacetamida (IAA,

14 mM) para alquilação das cisteínas, após agitação em *vórtex*, as amostras foram acondicionadas na ausência de luz durante 30 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 3,11 μL de DTT (5 mM), com incubação em temperatura ambiente durante 15 minutos. As amostras então foram diluídas em 1/5 de bicarbonato de amônio (50 mM), seguida pela adição de 18,68 μL de CaCl_2 (1 mM). Preparou-se uma solução de tripsina 20 ng μL^{-1} (preparado em NH_4HCO_3 50 mM, a -20°C) para a digestão enzimática em uma proporção de 1:50 (enzima:substrato). As amostras foram incubadas à 37°C , por 16 horas. Após esse período foi adicionado ácido trifluoacético (TFA) preparado em água milliQ, na concentração final de 0,4 % do volume das amostras para interromper a reação enzimática.

2.2.4 Dessalinização das amostras

Para a dessalinização das amostras foram utilizadas colunas *Sep-Pak* (Oasis) C18 de 1 mL de capacidade e 50 mg de fase sólida. As colunas foram ativadas com 3 mL de acetonitrila (ACN, 100 %), logo após foi equilibrada com 1 mL de ACN 50 % contendo 0,1 % de ácido fórmico, e 3 mL de ácido trifluoacético a 0,1 %. As colunas foram carregadas individualmente com as amostras e lavadas com 3 mL de ácido trifluoacético a 0,1 %, sendo equilibradas depois com 1 mL de ácido fórmico a 0,1 %. A eluição foi realizada em 2 mL e 1 mL de ACN a 50 % e 80 %, respectivamente, contendo 0,1 % de ácido fórmico. Por fim as amostras foram secas em concentrador a vácuo e ressuspensas em 50 μL de formiato de amônio (10 mM).

2.2.5 Fracionamento das proteínas (2D-UPLC-MS^E)

Foram digeridos 50 μg de peptídeos que foram injetados no cromatógrafo Nano Acquity UPLC (Waters), configurado para um fracionamento em duas dimensões. Para a primeira dimensão utilizou-se uma coluna analítica de 5 μm XBridgeTMBEH130 C18 (300 μm x 50 mm) em um fluxo de 2 μL por minuto. Na segunda dimensão utilizou-se uma coluna *trap* C18,5 μm (180 μm x 20 mm) e uma coluna analítica 1.7 μm BEH130TM C18 1.8 μm (100 μm x 100 mm) em um fluxo de 400 nL.min⁻¹. Amostras foram separadas em 5 frações a partir de um gradiente de 10.8, 14.0, 16.7, 20.4 e 65.0 % de acetonitrila.

O cromatógrafo foi acoplado diretamente a um espectrômetro de massas ESI-Q-ToF Synapt G2S (Waters) operando em modo positivo, e fragmentação contínua (MS^E) com a

energia de colisão oscilando entre 5 a 40 eV. Foram adquiridos espectros de massas dentro da faixa de 50 a 1200 Da, com *scan* de 0,5 segundos e intervalo entre *scans* de 0,1 segundos. A largura do pico e resolução dos espectros de massas foram configurados no modo automático. O peptídeo (lockmass) [Glu-1]-fibrinopeptídeo, de massa 785.4827 Da e cargas +2, foi utilizado como referência e lido a cada 30 segundos (segundo configurações do lockmass spray).

2.2.6 Bioinformática e estatística

Os dados brutos foram processados no programa *Proteinlynx Global Server* (PLGS) 3.0.2, utilizando uma base de dados da subfamília *Byttnerioideae*, pertencente a família das *Malvaceae*, mesma família do cupuaçuzeiro, por ser o proteoma conhecido mais próximo para comparação. A validação dos resultados e quantificação relativa foram realizadas no programa *Scaffold 4* (Proteome Software).

A identificação das proteínas somente era aceita se a probabilidade de identificação dos peptídeos fosse $\geq 90\%$, calculada pelo algoritmo *Peptide Prophet* e as proteínas com 95%, segundo *Protein Prophet* (NESVIZHSHKII et al., 2003). O teste de permutação foi aplicado considerando $p < 0.05$. Consideramos para este trabalho proteínas mais abundantes as de valores de $\log_2 \text{fold change } p \geq 0,5$, e proteínas menos abundantes as de valores de $\log_2 \text{fold change } p \leq -0,5$. Também foram destacadas somente proteínas identificadas em, pelo menos, duas das três replicatas analisadas para cada condição.

Na análise proteômica foram comparados os proteomas de raízes de plantas de duas progênies de cupuaçuzeiros: progênie 57, possivelmente mais tolerante; e progênie 1074, mais sensível ao déficit hídrico (DH). As plantas foram submetidas ao deficit hídrico visando identificar quais proteínas foram mais ou menos acumuladas pelas progênies durante a indução do estresse.

Foram realizadas 3 comparações de perfis proteicos em resposta ao deficit hídrico, primeiramente comparando as mesmas progênies entre si sob tratamentos diferentes (57DHx57C e 1074DHx1074C), depois comparamos os perfis das duas progênies quando submetidas ao deficit (1074DH x 57DH), com objetivo de avaliar, por meio de comparação de trabalhos semelhantes, as proteínas envolvidas na promoção da tolerância da planta. A anotação funcional das proteínas foi realizada no programa Blast2GO versão 5.1 (Biobam). O

heatmap foi produzido no site <http://www2.heatmapper.ca/expression/>, onde foram utilizadas as especificações básicas *Scale Type: None, Clustering Method: Complete Linkage e Distance Measurement Method:Euclidean*.

2.3. Resultados

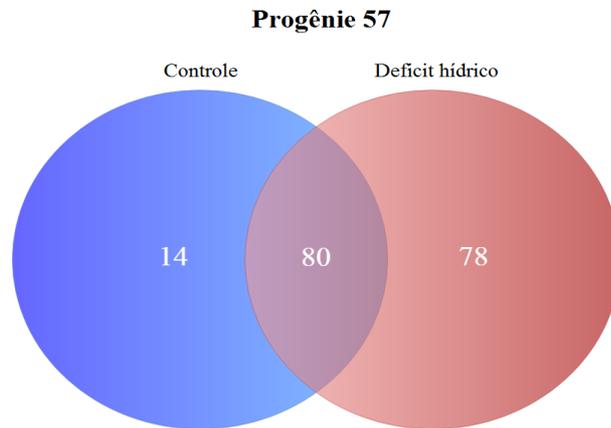
2.3.1. Acúmulo de proteínas

As análises por 2D-UPLC/MS^E identificaram um total de 523 proteínas em raízes de *Theobroma grandiflorum*. Houve diferença no acúmulo de proteínas tanto na comparação entre plantas controle e tratamento da mesma progênie, bem como comparando as duas progênies sob deficit hídrico.

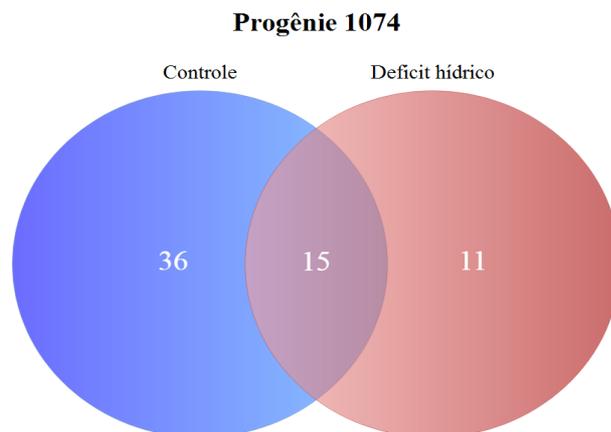
Na comparação entre os tratamentos da progênie 57 (57DHx57C) das 172 proteínas identificadas, 14 foram identificadas somente em plantas controle, enquanto 78 foram identificadas somente em plantas sob deficit hídrico e 80 ocorreram nas duas condições (Figura 2a). Na comparação da progênie 1074 (1074DHx1074C), do total das 62 proteínas identificadas, 36 foram identificadas somente em plantas controle, enquanto 11 foram identificadas somente em plantas sob deficit hídrico e 15 foram identificadas nas duas condições (Figura 2b). Na comparação entre as duas progênies sob deficit hídrico (1074DHx57DH), foram identificadas 199 proteínas no total, onde 98 foram identificadas somente na progênie 57 sob deficit hídrico (57DH), 101 proteínas identificadas nas duas progênies e nenhuma proteína foi identificada somente nas plantas da progênie 1074 sob deficit hídrico (1074DH) (Figura 2c).

Figura 2 - Diagramas de Venn das proteínas identificadas em raízes de *Theobroma grandiflorum* na comparação entre plantas controle e sob deficit hídrico das progênies 57 (A) e 1074 (B) e na comparação entre as duas progênies sob deficit hídrico (C).

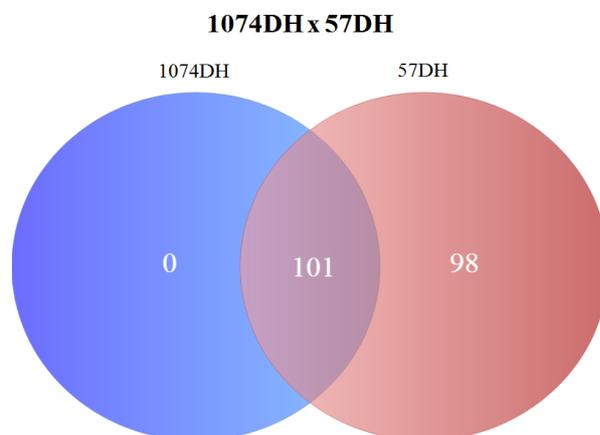
(A)



(B)



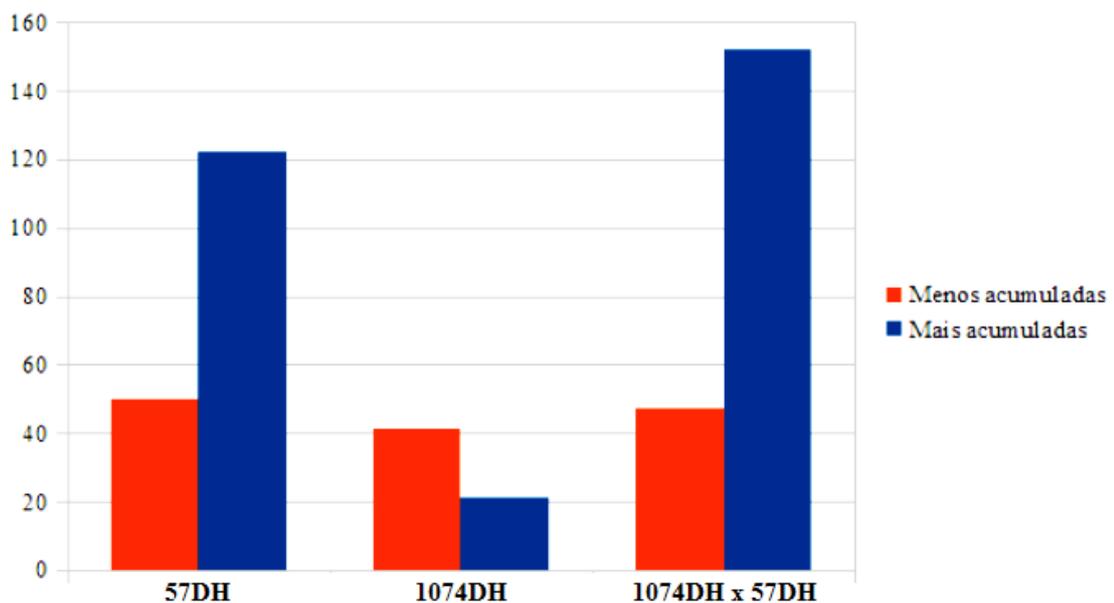
(C)



2.3.2 Acúmulo diferencial de proteínas

Diversas proteínas foram diferencialmente acumuladas comparando as progênes 57DH e 1074DH com seus respectivos controles e na comparação entre as duas progênes sob déficit hídrico (Figura 3). Na progênie 57, 122 proteínas foram mais acumuladas, enquanto 50 proteínas foram identificadas em menores níveis. Na progênie 1074, 21 proteínas foram mais acumuladas, enquanto 41 apresentaram menor acúmulo. Na comparação 1074DHx57DH, 152 proteínas foram mais acumuladas e 47 proteínas foram menos acumuladas na 57DH em relação a 1074DH.

Figura 3 - Número de proteínas mais ou menos acumuladas na progênie 57 e 1074 sob déficit hídrico comparando com os seus respectivos controles e na comparação 1074DHx57DH.



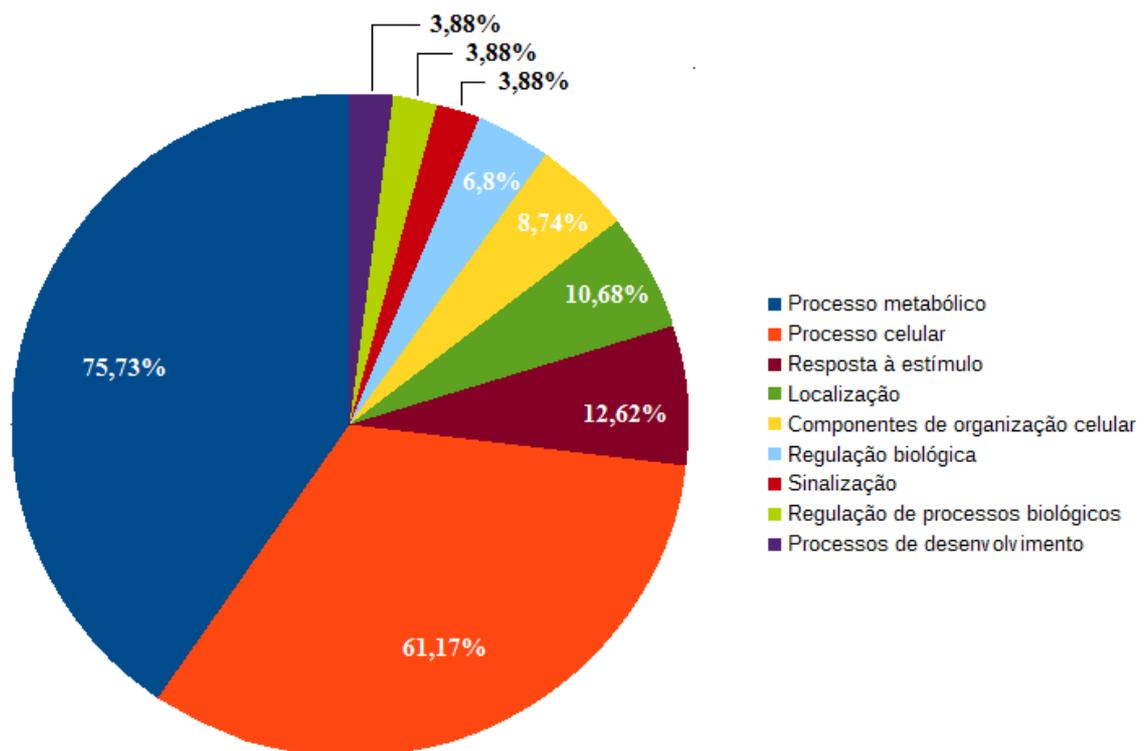
Fonte: A autora, 2018.

2.3.3. Anotação funcional das proteínas

Considerando a importância das diversas proteínas que foram mais acumuladas na 57DH em comparação à 1074DH, optou-se por um maior destaque as proteínas identificadas nesta comparação. Assim, foi realizada a anotação funcional dessas proteínas, possibilitando atribuí-las a um ou mais processos biológicos, sendo classificadas em nove categorias (Figura 4). As proteínas foram anotadas em processo metabólico (75,73%), processo celular (61,17%), resposta a estímulos (12,62%), localização (10,68%), componentes de organização

celular (8,74%), regulação biológica (6,8%), sinalização (3,88%), regulação de processos biológicos (3,88%) e processos de desenvolvimento (3,88%) (Figura 4).

Figura 4 - Classificação funcional das proteínas identificadas em raízes de cupuaçuzeiro mais acumuladas na progênie 57 na comparação 1074DHx57DH.



Fonte: A autora, 2018.

Entre as proteínas mais acumuladas na 57DH em comparação à 1074DH, destacam-se as relacionadas a resposta a estresse, principalmente aquelas que podem estar envolvidas na resposta ao deficit hídrico, e proteínas envolvidas no metabolismo energético devido a importância deste metabolismo primário para a sobrevivência de plantas em condições adversas.

2.3.3.1 Resposta a estresse

Foram identificadas 15 proteínas associadas a resposta a estresse diferencialmente acumuladas na comparação 1074DH x 57DH. Treze proteínas foram mais acumuladas nas plantas 57DH, sendo que nove foram identificadas somente nesse tratamento. Dentre as

proteínas destaca-se a *abscisic stress-ripening protein 3-like*. Outras oito proteínas relacionadas a resposta a estresse também foram mais acumuladas na 57DH, enquanto quatro proteínas apresentaram aumento sutil. Outras duas proteínas foram menos acumuladas nas plantas 57DH (Tabela 2).

Tabela 2 - Proteínas diferencialmente abundantes relacionadas direta ou indiretamente a resposta a estresse em raízes de cupuaçuzeiros da progênie 57 em relação a progênie 1074 submetidas ao déficit hídrico.

Proteínas	Número de Acesso	Espécie	PM (kDa)	Intensidade Normalizada
				1074DH x 57DH
Absciscic stress-ripening protein 3-like	XP_021284668.1	<i>Herrania umbratica</i>	15	57DH*
Acidic endochitinase-like	XP_021280017.1	<i>Herrania umbratica</i>	33	57DH*
Cinnamyl alcohol dehydrogenase 1	EOX98363.1	<i>Theobroma cacao</i>	39	57DH*
DNA repair RAD52-like protein 1, mitochondrial isoform X1	XP_021300046.1	<i>Herrania umbratica</i>	19	57DH*
Ribosomal protein S3 family protein	EOY30307.1	<i>Theobroma cacao</i>	26	57DH
Temperature-induced lipocalin-1	XP_021276354.1	<i>Herrania umbratica</i>	21	57DH*
Glutathione S-transferase	EOY33033.1	<i>Theobroma cacao</i>	24	57DH
Chaperonin 60 subunit beta 3, chloroplastic	XP_021278997.1	<i>Herrania umbratica</i>	64	57DH*
Peroxidase 72	XP_021273907.1	<i>Herrania umbratica</i>	37	57DH*
Endochitinase 1	XP_021285794.1	<i>Herrania umbratica</i>	35	1,98
Peroxidase 15-like	XP_021278022.1	<i>Herrania umbratica</i>	39	1,16
Xylose isomerase	XP_017984836.1	<i>Theobroma cacao</i>	54	0,73
Heat shock cognate protein 80	XP_021288832.1	<i>Herrania umbratica</i>	80	0,59
Peroxidase 68	EOY34663.1	<i>Theobroma cacao</i>	63	-2,87
Osmotin 34	EOY24666.1	<i>Theobroma cacao</i>	26	-0,72

PM= Peso Molecular. *Significante para $p < 0,05$. 57DH= Proteína identificada somente na planta da progênie 57 sob déficit hídrico.

Fonte: A autora, 2018.

2.3.3.2 Metabolismo energético.

Foram identificadas 21 proteínas associadas ao metabolismo energético diferencialmente acumuladas na comparação 1074DH x 57DH

Treze proteínas foram mais acumuladas nas plantas 57DH comparadas a 1074DH, sendo oito delas identificadas somente na 57DH. Em contrapartida, oito diminuíram seu acúmulo nas plantas 57DH, conforme pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela 3 - Proteínas diferencialmente abundantes relacionadas direta ou indiretamente ao metabolismo energético em raízes de cupuaçuzeiros da progênie 57 em relação a progênie 1074 submetidas ao deficit hídrico.

Proteínas	Número de Acesso	Espécie	PM (kDa)	Intensidade Normalizada
				1074DH x 57DH
Aspartic proteinase	XP_007020768.2	<i>Theobroma cacao</i>	56	57DH*
Alpha-mannosidase At5g13980	XP_021298038.1	Herrania umbratica	115	57DH*
Two pore calcium channel protein 1 isoform X1	XP_021287884.1	Herrania umbratica	85	57DH*
Farnesylcysteine lyase	XP_021273675.1	Herrania umbratica	56	57DH*
Sucrose synthase	XP_021276144.1	Herrania umbratica	98	57DH*
Reversibly glycosylated polypeptide 3	EOY22128.1	<i>Theobroma cacao</i>	41	57DH*
UDP-arabinopyranose mutase 1	XP_021296386.1	Herrania umbratica	41	57DH*
Plastidial pyruvate kinase 2	XP_021275021.1	Herrania umbratica	64	57DH*
Lactate/malate dehydrogenase family protein	EOY13192.1	<i>Theobroma cacao</i>	35	2,48
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	XP_021290136.1	Herrania umbratica	61	1,79
Hexokinase-1-like	XP_021277695.1	Herrania umbratica	54	1,42
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic	XP_021298931.1	Herrania umbratica	37	1,2
Pyruvate kinase, cytosolic isozyme	XP_021298468.1	Herrania umbratica	55	0,79
Aspartic proteinase A1-like	XP_021274894.1	Herrania umbratica	55	-6,51
Pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha	XP_021283977.1	Herrania umbratica	67	-5,38
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPCP1, chloroplastic	XP_021299446.1	Herrania umbratica	45	-3,29
Phosphoglucomutase, cytoplasmic	XP_007045214.2	<i>Theobroma cacao</i>	63	-2,18
Triosephosphate isomerase, cytosolic	XP_021295575.1	Herrania umbratica	27	-0,95
Enolase	XP_021286172.1	Herrania umbratica	48	-0,85
Farnesyl pyrophosphate synthase 1	XP_021294176.1	Herrania umbratica	40	-0,7
Fructokinase-6, chloroplastic	XP_021296708.1	Herrania umbratica	41	-0,55

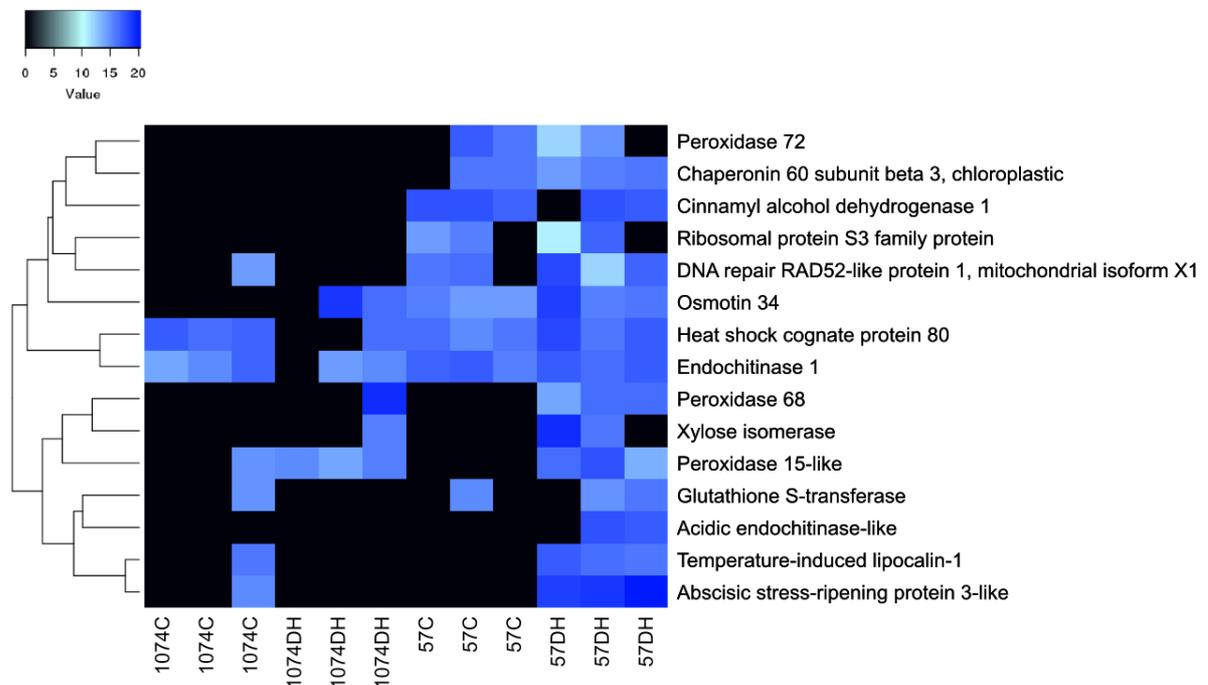
PM= Peso Molecular. *Significante para $p < 0,05$. 57DH= Proteína identificada somente na planta da progênie 57 sob deficit hídrico.

Fonte: A autora, 2018.

Foram produzidos mapas de calor (*heatmaps*) para melhor visualizar o acúmulo diferencial com base nas intensidades identificadas das três replicatas de cada condição (Figura 5). As cores do mapa de calor correspondem aos níveis de intensidade das proteínas em uma escala de cores. Proteínas mais acumuladas são indicadas no gradiente de cor em tons azuis escuro, e proteínas menos acumuladas em uma dada condição são indicadas no gradiente em tons de cor azul-claro. A coloração preta indica proteínas não detectadas. Neste contexto foram destacadas proteínas relacionadas a resposta a estresse (A) e proteínas envolvidas no metabolismo energético (B) apresentadas nas tabelas 2 e 3, incluindo proteínas identificadas em 57C, 57DH, 1074C e 1074 DH.

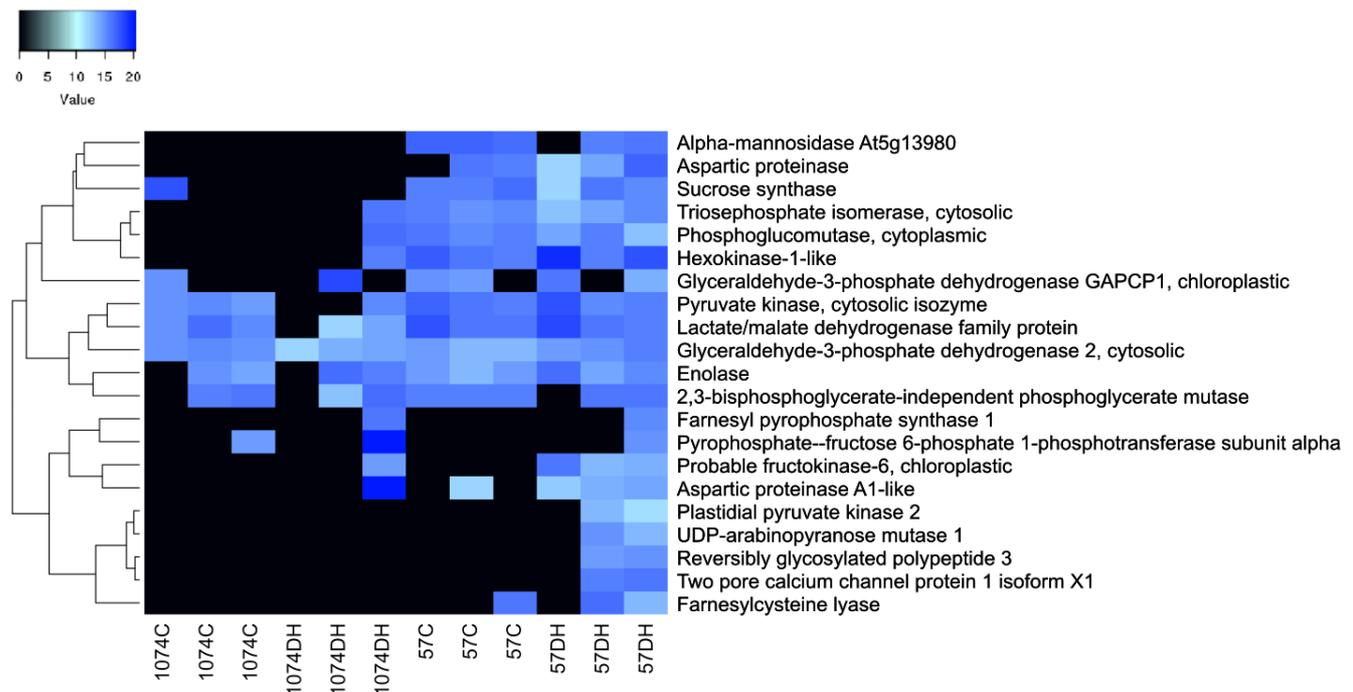
Figura 5 – Agrupamento hierárquico de proteínas com acúmulo diferencial em raízes de cupuacuzeiros sob deficit hídrico. (a) Proteínas relacionadas a resposta a estresse. (b) Proteínas envolvidas no metabolismo energético. Foram analisadas três replicatas técnicas para cada condição (controle-C e deficit hídrico-DH das progênies 57 e 1074).

(A)



Fonte: A autora, 2018.

(5b)



Fonte: A autora, 2018.

Foi possível observar que tanto as proteínas de resposta a estresse quanto as envolvidas no metabolismo energético foram mais acumuladas na progênie 57, sendo que o maior acúmulo de algumas dessas proteínas ocorreu em 57DH. Proteínas relacionadas à resposta a estresses como a *Glutathione S-transferase*, *abscisic stress-ripening protein 3-like*, *acidic endochitinase-like* e *temperature-induced lipocalin-1* foram identificadas principalmente em 57DH, enquanto outras proteínas foram identificadas em mais de uma replicata desta progênie mesmo sem estar sob déficit hídrico. Da mesma forma, diversas proteínas observadas na figura 5B, relacionadas ao metabolismo energético, foram mais acumuladas na progênie 57C e 57DH, sendo as proteínas *plastidial pyruvate kinase 2*, *UDP-arabinopyranose mutase 1*, *reversibly glycosylated polypeptide 3* e *two pore calcium channel protein 1 isoform X1* identificadas somente em 57DH.

2.4. Discussão

A seca é um fator que limita a produtividade das culturas em todo o mundo e o cultivo de espécies vegetais que apresentem maior resistência a esse estresse é fundamental para a estabilidade dos níveis de produtividade (BAJJI et al., 2001). No entanto, a triagem de cultivares resistentes a seca para garantir boa produtividade tem sido uma tarefa longa e tediosa que, sem dúvida, seria acelerada se as características certamente relacionadas ao estresse hídrico fossem identificadas (BAJJI et al., 2001)

As primeiras espécies vegetais estudadas utilizando proteômica foram milho (*Zea mays*) (TOUZET et al., 1996) e *Arabidopsis thaliana* (SAHNOUN et al., 2000), tendo como objetivo compreender funções e interações das proteínas entre si e com outras moléculas durante o crescimento e diferenciação celular, bem como suas modificações para que se adequem às necessidades do crescimento e desenvolvimento programados (JORRÍN-NOVO, 2015).

2.4.1 Proteínas de resposta a estresse

Proteínas relacionadas a resposta a estresses foram mais acumuladas na progênie 57 que na progênie 1074, podendo este resultado estar relacionado com a maior resistência da progênie 57 sob deficit hídrico observada neste experimento. Plantas que apresentaram um fenótipo mais sensível sob deficit hídrico (1074) podem ter apresentado degradação ou perda de funções de tais proteínas nessas condições, enquanto plantas da progênie 57 demonstraram uma resposta mais eficiente. Em um estudo realizado por Bastos (2017), foram avaliadas as respostas fisiológicas e taxas de sobrevivência de várias progênies de cupuaçuzeiros submetidas ao deficit hídrico, incluindo as progênies 57 e 1074, onde a progênie 57 apresentou menor susceptibilidade aos efeitos negativos do estresse para a maioria dos parâmetros morfofisiológicos estudados. Por outro lado, a progênie 1074 apresentou menor desempenho geral para as taxas de crescimento e severas reduções nas respostas fisiológicas e taxa de sobrevivência.

Em nosso estudo, na progênie 57 a *abscisic stress-ripening protein 3-like* (ASR) foi a proteína mais acumuladas em condição de deficit hídrico (DH). Alguns trabalhos sugerem que a proteína ASR está envolvida na expressão de genes responsáveis pelo metabolismo de açúcares e na via de sinalização do ABA (CAKIR et al., 2003; YANG et al., 2005; FRANKEL

et al., 2007). Plantas submetidas ao déficit hídrico produzem altos níveis de ABA na raiz, sendo esse transportado via xilema para a parte aérea para atuar como sinalizador promovendo o fechamento estomático, evitando assim a perda de água por transpiração (LIVINE & VAADIA, 1972). Portanto há uma relação entre ASR e ABA que estão envolvidos na capacidade de sobrevivência da planta em condições de déficit hídrico. No entanto, há relatos de alguns genes da ASR não responsivos ao ABA (VIRLOUVET et al., 2011). As proteínas ASRs podem possuir a função de protetoras de outras proteínas devido ao seu baixo peso molecular e a alta hidrofobicidade, função semelhante à das proteínas abundantes da embriogênese tardia (LEA), e a localização nuclear das ASRs e sua interação direta com o DNA sugerem que essas proteínas podem atuar como reguladoras transcricionais (MASKIN et al., 2001; WANG et al., 2003; CARRARI et al., 2004). Pérez-Díaz et al. (2013) mostraram, em trabalhos com arroz, que os genes *OsASR* podem ter uma função particular em tecidos específicos com a atividade de fonte, muito provavelmente para o transporte de açúcares.

A proteína *chaperonin 60 subunit beta 3, chloroplastic*, também foi identificada com acúmulo superior em plantas da 57DH. As chaperoninas do tipo I funcionam como uma excelente maquinaria de processamento protéico, conhecidas como GroEL-GroES em *E. coli*, chaperoninas 60-10 (Cpn60 até Cpn10) em cloroplastos, e Heat shock protein 6010 (HSP60-HSP10) nas mitocôndrias (GRUBER et al., 2013). As chaperoninas são proteínas que ajudam no dobramento correto da estrutura tridimensional durante a síntese de outras proteínas (LEE e TSAI, 2005). Estudos já demonstraram que a inibição da fotossíntese pelo estresse térmico moderado é uma consequência da desativação da rubisco, em parte causada pela instabilidade térmica da rubisco ativase (MEDRANO et al., 1997). No trabalho realizado por Salvucci, (2008) plantas transgênicas de *Arabidopsis* continham uma forma modificada de rubisco ativase que potencializavam a sua afinidade com proteínas que interagem com a rubisco ativase durante o estresse térmico. Uma dessas proteínas de interação foi identificada como sendo a subunidade b da chaperonina-60 (cpn60b), que se liga a rubisco ativase em plantas submetidas ao estresse por altas temperaturas. O papel das chaperoninas relacionado a resposta ao estresse por déficit hídrico foi documentado em estudos anteriores com plantas de trigo submetidas a seca (DEMIREVSKA et al., 2008a, b). Esses resultados sustentam a ideia de que as chaperoninas são necessárias não só por seu papel na atividade da rubisco, mas também em tecidos vegetais durante o déficit hídrico, seu acúmulo se dá por mudanças no metabolismo da planta para proteger as células por meio da manutenção da homeostase

celular e da correta conformação de proteínas afetadas pela seca.

As Heat Shock Proteins (HSPs) são chaperonas divididas de acordo com homologia e peso molecular e estão localizadas em compartimentos subcelulares como retículo endoplasmático, citossol, mitocôndrias e plastídeos (SUNG e GUY, 2003). Foi encontrada uma HSPs, *heat shock cognate protein 80*, mais acumulada em plantas 57DH relacionada a resposta ao estresse. As HSPs são descritas como um grupo de proteínas que são induzidas em condições de estresse com a função de proteção e reparo dos danos (LIU et al., 2007; SU e LI, 2008; SATO e YOKOYA, 2008). Foi descoberto que HSPs também podem substituir a função estabilizadora das desidrinas durante uma combinação de déficit hídrico e choque térmico, fazendo com que essas não sejam mais necessárias para a proteção celular relacionada à seca (RIZHSKY et al., 2002). A indução de HSPs foi relatada tanto em plantas cultivadas em laboratório quanto em campo quando submetidas ao estresse hídrico (PRASAD, 1997; AUGUSTINE et al., 2015a). Em *Erianthus arundinaceus*, uma planta altamente tolerante à seca, a HSP70 foi expressa sete vezes mais sob condições de déficit hídrico em comparação com as plantas irrigadas (AUGUSTINE et al, 2015b), mostrando que o acúmulo diferencial desta proteína está relacionada com a manutenção da homeostase celular sob condições de déficit hídrico.

Plantas 57DH acumularam mais proteínas que concedem tolerância a estresse biótico e abiótico, como a *acidic endochitinase-like* e *endochitinase 1*. Esta proteína está relacionada a defesa contra patógenos, porém, em um estudo com tomates (KUMAR, 2016) foi demonstrado que a quitinase em conjunto com a osmotina de alguma forma, são capazes de proteger a atividade da clorofila e PSII sob condições de estresse biótico e abiótico. Também foi relatado no mesmo trabalho que a quitina interage com a fosfofrutoquinase 2, uma enzima envolvida na glicólise, desempenhando um papel na melhoria da biomassa das raízes e como a interação entre os genes da osmotina e quitina se torna muito interessante para aplicação em programas de melhoramento de culturas. No presente trabalho a *osmotin 34* foi menos acumulada nas plantas 57DH, mas estava presente, mostrando que essa interação pode ter ocorrido e contribuído na promoção de tolerância ao déficit hídrico.

Plantas 57DH acumularam a proteína *xylose isomerase*. Em um trabalho realizado com plantas de arroz submetidas ao déficit hídrico, Yang et al (2006) relataram que a xilose isomerase e o gene *XTH* codificaram duas enzimas codificadoras de xiloglucano, e que a biossíntese do xiloglucano regulado nos estágios iniciais após a aplicação do estresse

desempenhou um papel no alongamento das raízes contribuindo com a manutenção do crescimento radicular sob estresse.

A proteína *cinnamyl alcohol dehydrogenase 1* foi mais acumulada em plantas 57DH, e a cinamil álcool desidrogenase é uma enzima chave na síntese de lignina.

A lignina é um polímero altamente ramificado de compostos fenilpropanóides, depois da celulose, a lignina é o segundo composto orgânico mais abundante nas plantas, representando aproximadamente 30% do carbono orgânico na biosfera (BOERJAN et al., 2003). O metabolismo da lignina desempenha um papel importante no crescimento e desenvolvimento das plantas. Como um polímero fenólico complexo, a lignina aumenta a rigidez da parede celular, as propriedades hidrofóbicas e promove o transporte de minerais através dos feixes vasculares na planta. Além disso, a lignina é uma barreira importante que protege contra pragas e patógenos. O metabolismo da lignina também pode ser relacionado a promoção de resistência das plantas em resposta a vários estresses ambientais (LIU et al., 2018).

Células vegetais estão sujeitas a altos níveis de danos no DNA, como a quebra de cadeias simples e duplas (DSBs) resultantes de vários tipos de estresses, entre eles o de déficit hídrico. Assim, para manter a estabilidade do genoma, os DSBs são reparados por dois mecanismos fundamentais: a recombinação homóloga (RH) e a via de junção não homóloga (NHEJ). A via da RH é mediada por proteínas de grupos de epistasia como o RAD52 (ROY, 2014). Em nosso trabalho a proteína *DNA repair RAD52-like protein 1, mitochondrial isoform XI* foi mais acumulada em plantas 57DH, possivelmente por essas plantas estarem apresentando uma maior atividade de reparo de danos no seu DNA causado pelo déficit hídrico.

A proteína *ribosomal protein S3 family protein* foi acumulada em maior nível na planta 57DH. As proteínas ribossômicas (RPs) são conhecidas por seus papéis universais, por formar e dar estabilidade ao complexo ribossomal e na mediação da síntese de proteínas. Os genes *RPs* são regulados de diferentes maneiras por fatores ambientais, tanto abióticos como bióticos, que afetam diretamente o crescimento das plantas e a regulação transcricional dos genes *RP* e, em última instância, a biogênese do ribossomo (MOIN, 2017).

A proteína *temperature-induced lipocalin-1* também apresentou maior acúmulo nas plantas 57DH. As lipocalinas induzidas pela temperatura (TIL) são proteínas localizadas no plasma e respondem a estresses ambientais. He et al. (2015) em um trabalho com tabaco

avaliaram a superexpressão do gene das TIL em resposta a diversos estresses, como seca, salinidade, congelamento, resfriamento e estresse oxidativo, porém as plantas que superexpressaram as TIL responderam positivamente ao estresse por altas temperaturas, mas não responderam a desidratação e salinidade.

Glutathione S-transferases são uma família de enzimas de desintoxicação bem caracterizada envolvida na tolerância ao estresse, que atua catalisando a conjugação da glutathione reduzida (GSH) a substratos eletrofilicos (XU et al., 2015). A glutathione S-transferase (GST) é estimulada por vários estresses, como infecção por patógenos, aplicação de herbicidas, peróxido de hidrogênio, ozônio, ácido 2,4-diclorofenoxi-acético, metais pesados, seca, senescência, danos físicos, hipóxia, e salinidade. Nas plantas, a expressão de GST é induzida por fitormônios, como ácido salicílico, etileno, citocinina, auxina, ácido abscísico, metil jasmonato e brassinoesteróide (CHEN et al., 2012). A proteína glutathione S-transferase foi mais acumulada em plantas 57DH em comparação a plantas 1074 DH.

O sistema antioxidante protetor consiste em substâncias de alto e baixo peso molecular. As enzimas peroxidases são de alto peso molecular, capazes de eliminar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) formado durante a dismutação enzimática ou não enzimática (CAVALCANTI et al., 2004). As plantas 57DH acumularam em maiores níveis duas peroxidases, *peroxidase 72* e *peroxidase 15-like* e diminuíram o acúmulo da proteína *peroxidase 68* em comparação as plantas 1074DH. Csiszár et al. (2011) avaliaram o impacto do estresse osmótico no crescimento radicular e no teor relativo de água de duas cultivares de milho por meio do acúmulo e atividade de peroxidases, foram observados aumentos na atividade da peroxidase correlacionada com as respostas à níveis de H_2O_2 na cultivar tolerante e aumento da peroxidase ligada a parede celular na cultivar sensível, concluindo-se que essas mudanças são partes da estratégia de adaptação a longo prazo das plantas.

2.4.2 Proteínas do metabolismo energético

Para um melhor entendimento das vias metabólicas que são ativadas em raízes de cupuaçuzeiros sob deficit hídrico foi feita uma análise pelo programa Blast2GO das proteínas identificadas que foram diferencialmente acumuladas e acrescidas de outras proteínas consideradas importantes segunda a literatura relacionadas ao metabolismo energético.

Duas formas de proteinase aspártica foram encontradas na comparação 1074DH x

57DH, sendo a proteína *aspartic proteinase* identificada somente na planta 57DH e a *aspartic proteinase AI-like* mais acumulada nas plantas 1074DH. As proteases aspárticas (APs) são uma subfamília de enzimas proteolíticas que possuem dois aspartatos altamente conservados para a catálise dos seus substratos peptídicos (SZECSI, 1992). APs de plantas estão relacionadas com o processamento de proteínas e/ou degradação em diferentes órgãos da planta. Acredita-se que elas desempenham um papel na senescência da planta, respostas ao estresse, morte celular programada e reprodução (SIMOES e FARO, 2004). Em contraste com as APs de origem animal e microbiana, existem poucos estudos sobre as APs de plantas relatando suas funções bioquímicas e fisiológicas (PRASAD et al., 2010). Além disso, a maioria das análises em APs de plantas foram realizadas em espécies modelo, como *Arabidopsis* (FARO e GAL, 2007; XIA et al., 2004), pouco se tem documentado sobre a atividade das APs em espécies arbóreas como o cupuaçuzeiro. Wang et al. (2016) descreveram um aumento no acúmulo de proteases em resposta ao déficit hídrico em plantas, entre elas a proteinase aspártica em milho. Yao et al. (2011) em um trabalho com *Arabidopsis* descreveram um gene que codifica um tipo de proteinase aspártica podendo ser funcional na resistência da planta à seca por meio da sinalização do ABA. Logo, o acúmulo da proteinase aspártica na progênie 57 e a diminuição do seu acúmulo na progênie 1074 pode estar relacionado a resposta dependente de ABA e a tolerância ao déficit hídrico.

Outra proteína mais acumulada em plantas 57DH foi a *alpha-mannosidase At5g13980*. Kenefick et al. (2018) em um estudo com cultivares de trigo tolerantes e sensíveis ao frio submetidas ao déficit hídrico, relataram um acúmulo da proteína alfa-manosidase nas duas cultivares, tanto no grupo controle quanto no grupo sob estresse.

A proteína *two pore calcium channel protein 1 isoform XI* (TPC1) também apresentou maior acúmulo em plantas 57DH em comparação a plantas 1074DH. As plantas utilizam o íon cálcio (Ca^{2+}) como mensageiro na regulação do desenvolvimento e respostas a estímulos ambientais, e o fluxo desse íon ocorre por canais específicos como o canal de Ca^{2+} de dois poros localizados no vacúolo (ZHENG et al., 2017). Behringer et al. (2015), em um estudo de revisão, relatou que em *Arabidopsis* e arroz, o gene da proteína TPC1 é conhecido por ser expresso em vários tecidos, também foi identificado um gene homólogo de TPC1 que foi induzido em trigo (*triticum aestivum*) em resposta à alta salinidade, polietilenoglicol, baixa temperatura e tratamento com ácido abscísico, foi relatado um papel importante da TPC1 no fechamento estomático e na resposta ao estresse abiótico.

Os principais produtos das plantas são açúcares, e os açúcares glicose e frutose são as matérias-primas para a maioria das vias metabólicas, mas para serem metabolizadas, glicose e frutose devem primeiro ser fosforiladas. Em plantas, apenas duas famílias de enzimas são capazes de catalisar a fosforilação irreversível essencial de glicose e frutose: hexoquinases e frutocinases (GRANOT et al., 2014). A proteína *hexoquinase-1-like* foi mais acumulada nas plantas 57DH e a proteína *fructokinase-6, chloroplastic* foi mais acumulada nas plantas 1074DH. Açúcares solúveis elevados reprimem a expressão de genes associados à fotossíntese, em um processo em que as hexoquinases estão envolvidas na detecção desses açúcares (SMEEKENS, 1998). Um efeito importante da alta expressão da hexoquinase (HXK) é a senescência acelerada (QUIRINO et al., 2000). Ao contrário da HXK, não há evidências até o momento no envolvimento da frutocinase (FRK) na detecção de açúcar, porém, FRKs específicas podem atuar no controle da quantidade de açúcares alocada para o desenvolvimento dos tecidos vasculares. Assim, FRKs atuam em processos de desenvolvimento de longo prazo que são importantes para o transporte de açúcar, água e minerais (GRANOT et al., 2014). Em um estudo com girassol (*Helianthus annuus*), uma FRK plastídica foi regulada em conjunto com outras proteínas relacionadas ao metabolismo do carbono, em resposta ao estresse hídrico (FULDA et al., 2011), em um estudo com arroz (*Oryza sativa*), duas FRKs foram reguladas diferencialmente sob condições anóxicas, a expressão do gene *OsFK2* aumentou, enquanto a expressão do gene *OsFK1* diminuiu sob condições de baixo oxigênio (GUGLIELMINETTI et al., 2006).

A proteína *sucrose synthase* foi identificada somente em plantas 57DH. A sacarose sintetase (SUS) é uma das principais enzimas envolvidas na síntese de sacarose, principalmente em tecidos que não realizam fotossíntese. Esta enzima catalisa a conversão reversível de sacarose e glicose com difosfato de uridina (UDP) em UDP-glicose (UDP-G) e frutose (FU e PARK, 1995). A UDP-G pode ser utilizada para a síntese de celulose e paredes celulares, enquanto que a frutose fosforilada pode ser utilizada para produção de energia ou alimentada a outras vias metabólicas. A atividade da SUS pode ser inibida pela concentração do seu produto, a frutose, quando essa concentração excede 1 mM (SCHAFFER e PETREIKOV, 1997). A SUS foi acumulada em raízes de milho e arroz submetidas ao estresse osmótico e deficiência de O₂ (DÉJARDIN et al., 1999). Como a atividade da SUS não é inibida pela frutose-6-fosfato (F6P), que é o produto da FRK (MORELL e COPELAND, 1985; MATIC et al., 2004), a diminuição da concentração de frutose em consequência da sua

fosforilação pela FRK, pode ser necessária para direcionar a clivagem da sacarose pela SUS para promover o metabolismo e desenvolvimento vascular (GERMAN et al., 2003; DAMARI-WEISSLER et al., 2009). Em um estudo com a variedade de trigo Kauz, Jiang et al. (2012) afirmam que um maior acúmulo de sintetase da sacarose em conjunto com níveis conservados de ADP-glicose pirofosforilase resulta em maior síntese de amido, mesmo sob condições de seca, indicando que estas enzimas estão fortemente associadas à maior resistência dessa variedade de milho ao déficit hídrico.

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) catalisa a conversão do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato na via glicolítica, produzindo energia e fornecendo intermediários para o metabolismo celular (PLAXTON, 1996). A proteína *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic* apresentou um maior acúmulo em plantas 57DH, já a proteína *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPCPI, chloroplastic* diminuiu seu acúmulo em plantas 57DH. Kamal et al. (2012) mostraram a diminuição no acúmulo de três isoformas de GAPDH em cloroplastos de plântulas de trigo. No estudo de Ye et al. (2016) com gramíneas Bermudagrass (*Cynodon dactylon*) tolerantes a salinidade e déficit hídrico o acúmulo de GAPDH aumentou pelo estresse salino imposto, mas diminuiu pela seca. Nesse contexto, ainda não se pode afirmar sobre a possibilidade da GAPDH e dos níveis desta proteína identificados neste estudo estarem relacionadas à maior resistência ao déficit hídrico.

A piruvato quinase catalisa a etapa final da glicólise, convertendo ADP e fosfoenolpiruvato (PEP) em ATP e piruvato (BOYLE, 2005). Durante o estresse hídrico, a glicólise é reduzida em conjunto com a atividade da piruvato quinase (ATKIN & MACHEREL, 2009). Um estudo com variedades brasileiras de cana-de-açúcar, tolerantes e sensíveis à seca, identificou um transcrito (cDNA) de piruvato quinase, o qual foi expresso seis vezes mais em folhas de plantas sob déficit hídrico quando comparadas às plantas controle. Segundo os autores (RODRIGUES et al., 2009), a piruvato quinase foi essencial na regulação da glicólise. No presente trabalho a proteína piruvato quinase foi mais acumulada nas plantas 57DH sob duas formas, *plastidial pyruvate kinase 2* e *pyruvate kinase, cytosolic isozyme*, podendo indicar que esta proteína seja fundamental a nível de metabolismo primário à maior tolerância dessa progênie.

A proteína *lactate/malate dehydrogenase family protein*, mais acumulada em plantas 57DH, é uma enzima que catalisa a conversão de lactato em piruvato, o último passo na

glicólise anaeróbica (READ et al., 2001). A enzima malato desidrogenase catalisa a interconversão do malato em oxaloacetato (GLEASON et al., 1994), fazendo parte do ciclo do ácido cítrico. Babayev et al. (2015) demonstraram em um trabalho que as respostas às mudanças ambientais de milhos submetidos ao deficit hídrico estão relacionadas a mecanismos específicos, incluindo a formação de novas isoformas de enzimas do sistema malato desidrogenase, que são diferentes nas frações do cloroplasto e do citosol, dependendo das condições ambientais.

A proteína *enolase* foi menos acumulada em plantas 57DH em comparação as plantas 1074DH. A enolase é uma enzima glicolítica, que participa de vários processos metabólicos. O acúmulo da enolase foi relatada anteriormente em raízes de arroz em resposta ao estresse salino (YAN et al., 2005) e ao tratamento com polietilenoglicol (WANG et al, 2007). A existência de múltiplas isoformas de enolase em plantas tem sido relatada (VAN DER STRAETEN et al., 1991), sendo possível que a enolase identificada em nosso trabalho represente uma isoforma diferente, que responde diferentemente as condições de deficit hídrico.

2.4.3 Agrupamento hierárquico

No heatmap observamos um diferença no acúmulo de proteínas relacionadas a resposta a estresse e metabolismo energético entre plantas 57 DH e 1074DH, e seus respectivos controles. Foi possível verificar que as proteínas de resposta a estresse com maior acúmulo foram identificadas em plantas 57DH, tanto proteínas constitutivas, ou seja, que já apresentavam acúmulo nas plantas 57C, quanto proteínas que foram identificadas somente após a indução do estresse hídrico. O mesmo pode ser observado no grupo de proteínas relacionadas ao metabolismo energético. Esses resultados demonstram a grande heterogeneidade do comportamento das duas progênes sob estresse de deficit hídrico, onde o acúmulo diferencial das proteínas destacadas aqui pode estar relacionado à maior tolerância da progênie 57 a esse estresse ambiental.

2.5 Conclusão

A partir da análise do proteoma diferencial de raízes das progênies 57 e 1074 de cupuaçuzeiros submetidas ao déficit hídrico foi possível obter uma visão da resposta a esse déficit, por meio da identificação de proteínas envolvidas em diferentes rotas metabólicas fundamentais para a sobrevivência de plantas em condições de seca. Os resultados obtidos no presente estudo fornecem informações sobre o mecanismo molecular da progênie 57, possivelmente mais tolerante ao déficit hídrico. A partir dessas informações, estudos mais detalhados sobre os mecanismos moleculares relacionados às proteínas aqui identificadas devem contribuir para a descoberta de marcadores moleculares ou bioquímicos a serem utilizados no melhoramento genético de cupuaçuzeiros.

REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, Ruedi; MANN, Matthias. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198, 2003.

AGUSTÍ, Javier et al. Early gene expression events in the laminar abscission zone of abscission-promoted citrus leaves after a cycle of water stress/rehydration: involvement of CitbHLH1. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 17, p. 6079-6091, 2012.

ALVARENGA, I. C. A. et al. Prolina livre em alecrim-pimenta sob estresse hídrico antes da colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 539-541, 2011.

ALVAREZ, Sophie et al. Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. **Plant, Cell & Environment**, v. 31, n. 3, p. 325-340, 2008.

ALVES, R. M.; MARQUES, L. C. T.; FERREIRA, C.A. P.; FERNANDES, G. L. C.; SOUSA, L. P. de. Avaliação preliminar de clones de cupuaçuzeiro em área com acentuado déficit hídrico, utilizando o sistema "cabruco". **EMBRAPA-CPATU**, Belém, p. 4, 1999. (EMBRAPA-CPATU. Comunicado técnico, 104).

ALVES, RAFAEL MOYSÉS et al. Avaliação de clones de cupuaçuzeiro quanto a resistência a vassoura-de-bruxa. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1998.

ALVES, Rafael Moysés; FERREIRA, Fabrício Nascimento. BRS Carimbó: a nova cultivar de cupuaçuzeiro da Embrapa Amazônia Oriental. Embrapa Amazônia Oriental-**Comunicado Técnico** (INFOTECA-E), 2012.

ARAÚJO, DG de; CARVALHO, SAMUEL PEREIRA; ALVES, RAFAEL MOYSÉS. Divergência genética entre clones de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willd ex Spreng Schum). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 1, p. 13-21, 2002.

ATKIN, Owen K.; MACHEREL, David. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. **Annals of botany**, v. 103, n. 4, p. 581-597, 2008.

AUGUSTINE, Sruthy Maria et al. *Erianthus arundinaceus* HSP70 (EaHSP70) overexpression increases drought and salinity tolerance in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). **Plant Science**, v. 232, p. 23-34, 2015b.

AUGUSTINE, Sruthy Maria et al. Physiological and Molecular Insights to Drought Responsiveness in *Erianthus* spp. **Sugar Tech**, v. 17, n. 2, p. 121-129, 2015a.

BABAYEV, H. G. et al. NADP-malate Dehydrogenase Isoforms of Wheat Leaves under Drought: Their Localization, and Some physicochemical and Kinetic Properties. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 11, n. 3, 2015.

BAJJI, Mohammed; LUTTS, Stanley; KINET, Jean-Marie. Water deficit effects on solute

contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. **Plant Science**, v. 160, n. 4, p. 669-681, 2001.

BEHRINGER, David et al. Differential gene expression reveals candidate genes for drought stress response in *Abies alba* (Pinaceae). **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0124564, 2015.

BENESOVÁ, Monika et al. The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration?. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38017, 2012.

BENEVENTI, M. A. **Desenvolvimento de soja tolerante à seca e avaliação preliminar de biossegurança alimentar da proteína AtDREB1A**. 2010. 178 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BENKO-ISEPPON, A. M. et al. Prospecção de genes de resistência à seca e à salinidade em plantas nativas e cultivadas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 6, p. 1112-1134, 2011.

BOERJAN, Wout; RALPH, John; BAUCHER, Marie. Lignin biosynthesis. **Annual review of plant biology**, v. 54, n. 1, p. 519-546, 2003.

BOYLE, John. Lehninger principles of biochemistry: Nelson, D., and Cox, M. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 33, n. 1, p. 74-75, 2005.

BRASIL. IBGE. **Censo Agropecuário**, 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6617>>. Acesso em: 07 ago. 2018

BRAY, Elizabeth A. Plant responses to water deficit. **Trends in plant science**, v. 2, n. 2, p. 48-54, 1997.

BRAY, Elizabeth A. Response to abiotic stress. **Biochemistry and molecular biology of plants**, p. 1158-1203, 2000.

ÇAKIR, Birsen et al. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. **The Plant Cell**, v. 15, n. 9, p. 2165-2180, 2003.

CALZAVARA, Batista Benito G.; MÜLLER, C. H.; KAHWAGE, O. de N. Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro: cultivo, beneficiamento e utilização do fruto. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 1984.

CAO, Yuan et al. Physiological and proteomic analyses of the drought stress response in *Amygdalus Mira* (Koehne) Yü et Lu roots. **BMC plant biology**, v. 17, n. 1, p. 53, 2017.

CARRARI, Fernando; FERNIE, Alisdair R.; IUSEM, Norberto D. Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story. **Trends in plant science**, v. 9, n. 2, p. 57-59, 2004.

CAVALCANTI, Fabio Rossi et al. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, v. 163, n. 3, p. 563-571, 2004.

CHAVES, Manuela M.; MAROCO, Joao P.; PEREIRA, Joao S. Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. **Functional plant biology**, v. 30, n. 3, p. 239-264, 2003.

CHEN, Jui-Hung et al. Drought and salt stress tolerance of Arabidopsis glutathione S-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid. **Plant Physiology**, p. pp. 111.181875, 2011.

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

CHO, Kyoungwon et al. Integrated transcriptomics, proteomics, and metabolomics analyses to survey ozone responses in the leaves of rice seedling. **Journal of proteome research**, v. 7, n. 7, p. 2980-2998, 2008.

COSTA, Marta Cristina et al. Conservação de polpa de cupuaçu [*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum] por métodos combinados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 02, p. 213-215, 2003.

CSISZÁR, Jolán et al. Different peroxidase activities and expression of abiotic stress-related peroxidases in apical root segments of wheat genotypes with different drought stress tolerance under osmotic stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 119-129, 2012.

CUSTÓDIO, Nogueira Rejane Jurema Mansur et al. Comportamento estomático e potencial da água da folha em três espécies lenhosas cultivadas sob estresse hídrico. **Acta Botanica Brasílica**, v. 17, n. 2, p. 231-246, 2003.

DAMARI-WEISSLER, Hila et al. LeFRK2 is required for phloem and xylem differentiation and the transport of both sugar and water. **Planta**, v. 230, n. 4, p. 795-805, 2009.

DE ABREU, Carlos Eduardo Braga et al. Proteomic analysis of salt stress and recovery in leaves of *Vigna unguiculata* cultivars differing in salt tolerance. **Plant cell reports**, v. 33, n. 8, p. 1289-1306, 2014.

DE ALMEIDA, Odimar Ferreira et al. Seleção de progênies de cupuaçuzeiros tolerantes a vassoura-de-bruxa no Estado do Pará. In: **Embrapa Amazônia Oriental-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 64., São Luis, 2012. Ciência, cultura e saberes tradicionais para enfrentar a pobreza. São Luís: SBPC: UFMA, 2012.

DÉJARDIN, Annabelle; SOKOLOV, Lubomir N.; KLECZKOWSKI, Leszek A. Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in Arabidopsis. **Biochemical Journal**, v. 344, n. 2, p. 503-509, 1999.

DEMIREVSKA, K. et al. Drought-induced leaf protein alterations in sensitive and tolerant wheat varieties. **Gen Appl Plant Physiol**, v. 34, n. 1-2, p. 79-102, 2008b.

DEMIREVSKA, Klimentina et al. Rubisco and some chaperone protein responses to water stress and rewatering at early seedling growth of drought sensitive and tolerant wheat varieties. **Plant growth regulation**, v. 56, n. 2, p. 97, 2008a.

FAN, Ling et al. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. **Plant physiology**, v. 140, n. 2, p. 603-612, 2006.

FANG, Yujie; XIONG, Lizhong. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 4, p. 673-689, 2015.

FARO, Carlos; GAL, Susannah. Aspartic proteinase content of the Arabidopsis genome. **Current Protein and Peptide Science**, v. 6, n. 6, p. 493-500, 2005.

FAROOQ, M. et al. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In: **Sustainable agriculture**. Springer, Dordrecht, 2009. p. 153-188.

FERNANDES, J. R. Q.; **Efeito da restrição hídrica no comportamento de progênes de cupuaçuzeiros [Theobroma grandiflorum (Wild. ex. Spreng) Schum]**. 2016. 53f. (Trabalho de conclusão de curso) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2016.

FLEXAS, Jaume et al. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. **Functional Plant Biology**, v. 29, n. 4, p. 461-471, 2002.

FORYER, C.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **The New Phytologist**, v. 146, p. 359-388, 2000.

FRANKEL, Nicolás et al. ci21A/Asr1 expression influences glucose accumulation in potato tubers. **Plant molecular biology**, v. 63, n. 5, p. 719-730, 2007.

FU, Hongyong; PARK, William D. Sink-and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. **The Plant Cell**, v. 7, n. 9, p. 1369-1385, 1995.

FULDA, S. et al. Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant Biology**, v. 13, n. 4, p. 632-642, 2011.

GERMAN, Marcelo A. et al. Suppression of fructokinase encoded by LeFRK2 in tomato stem inhibits growth and causes wilting of young leaves. **The Plant Journal**, v. 34, n. 6, p. 837-846, 2003.

- GHATAK, Arindam et al. Comprehensive tissue-specific proteome analysis of drought stress responses in *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.(Pearl millet). **Journal of proteomics**, v. 143, p. 122-135, 2016.
- GLEASON, William B. et al. Refined crystal structure of mitochondrial malate dehydrogenase from porcine heart and the consensus structure for dicarboxylic acid oxidoreductases. **Biochemistry**, v. 33, n. 8, p. 2078-2088, 1994.
- GOLLDACK, Dortje; LÜKING, Ines; YANG, Oksoon. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. **Plant cell reports**, v. 30, n. 8, p. 1383-1391, 2011.
- GONDIM, TM de S. et al. Aspectos da produção de cupuaçu. **Embrapa Acre-Documentos (INFOTECA-E)**, 2001.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Raquel; PRATS, Elena; JORRÍN-NOVO, Jesús V. Proteomics of plant pathogenic fungi. **BioMed Research International**, v. 2010, 2010.
- GRANOT, David et al. Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 3, p. 809-819, 2013.
- GRUBER, Anna Vitlin et al. The complexity of chloroplast chaperonins. **Trends in plant science**, v. 18, n. 12, p. 688-694, 2013.
- GUGLIELMINETTI, L. et al. Differential expression of two fructokinases in *Oryza sativa* seedlings grown under aerobic and anaerobic conditions. **Journal of Plant Research**, v. 119, n. 4, p. 351-356, 2006.
- HAMDY, A.; RAGAB, Ragab; SCARASCIA-MUGNOZZA, Elisa. Coping with water scarcity: water saving and increasing water productivity. **Irrigation and drainage**, v. 52, n. 1, p. 3-20, 2003.
- HARB, Amal M.; SAMARAH, Nezar H. Physiological and molecular responses to controlled severe drought in two barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes. **Journal of Crop Improvement**, v. 29, n. 1, p. 82-94, 2015.
- HE, Xueying et al. A temperature induced lipocalin gene from *Medicago falcata* (MfTIL1) confers tolerance to cold and oxidative stress. **Plant molecular biology**, v. 87, n. 6, p. 645-654, 2015.
- HOMMA, Alfredo Kingo Oyama. O desenvolvimento da agroindústria no estado do Pará. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2007.
- HOMMA, A. K. O. Extrativismo vegetal na Amazônia: história, ecologia, economia e domesticação. **Embrapa Amazônia Oriental-Livro científico (ALICE)**, 2014.
- HOSSAIN, Mohammad Anwar et al. (Ed.). **Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 2:**

Molecular and Genetic Perspectives. Springer, 2016.

HUANG, Guo-Tao et al. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 2, p. 969-987, 2012.

HUBER, Steven C.; ROGERS, Hugo H.; MOWRY, Fred L. Effects of water stress on photosynthesis and carbon partitioning in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants grown in the field at different CO₂ levels. **Plant physiology**, v. 76, n. 1, p. 244-249, 1984.

JIANG, Shan-Shan et al. Wheat drought-responsive grain proteome analysis by linear and nonlinear 2-DE and MALDI-TOF mass spectrometry. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 12, p. 16065-16083, 2012.

JORRÍN-NOVO, Jesus V. et al. Plant proteomics update (2007–2008): second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **Journal of proteomics**, v. 72, n. 3, p. 285-314, 2009.

JORRÍN-NOVO, Jesus V. et al. Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: Moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. **Proteomics**, v. 15, n. 5-6, p. 1089-1112, 2015.

KALEFETOĞLU, Tuğçe; EKMEKCI, Yasemin. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. **Gazi University Journal of Science**, 2005.

KAMAL, Abu Hena Mostafa et al. Changes in physiology and protein abundance in salt-stressed wheat chloroplasts. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 9, p. 9059-9074, 2012.

KE, Yuqin et al. Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 379, n. 1, p. 133-138, 2009.

KENEFICK, D. G. et al. Influence of tissue water on protein secretion in winter wheat. In: **Advances in Plant Cold Hardiness**. CRC Press, 2018. p. 111-120.

KIM, Jae-Yean et al. A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. **Plant physiology**, v. 124, n. 1, p. 71-84, 2000.

KUMAR, A.; SINGH, D. P.; SINGH, Phool. Influence of water stress on photosynthesis, transpiration, water-use efficiency and yield of *Brassica juncea* L. **Field Crops Research**, v. 37, n. 2, p. 95-101, 1994.

KUMAR, S. Anil et al. Beyond just being foot soldiers—osmotin like protein (OLP) and chitinase (Chi11) genes act as sentinels to confront salt, drought, and fungal stress tolerance in tomato. **Environmental and Experimental Botany**, v. 132, p. 53-65, 2016.

KUSAKA, Masayuki; OHTA, Masaru; FUJIMURA, Tatsuhito. Contribution of inorganic

components to osmotic adjustment and leaf folding for drought tolerance in pearl millet. **Physiologia Plantarum**, v. 125, n. 4, p. 474-489, 2005.

LATA, Charu; MUTHAMILARASAN, Mehanathan; PRASAD, Manoj. Drought stress responses and signal transduction in plants. In: **Elucidation of abiotic stress signaling in plants**. Springer, New York, NY, 2015. p. 195-225.

LAWLOR, D. W □ ; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, cell & environment**, v. 25, n. 2, p. 275-294, 2002.

LECHINOSKI, Alessandro et al. Influência do estresse hídrico nos teores de proteínas e aminoácidos solúveis totais em folhas de Teca (*Tectona grandis* L. f). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 927-929, 2007.

LEE, Chun Pong et al. Heterogeneity of the mitochondrial proteome for photosynthetic and non-photosynthetic Arabidopsis metabolism. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, n. 7, p. 1297-1316, 2008.

LEE, Sukyeong et al. Molecular chaperones in protein quality control. **J Biochem Mol Biol**, v. 38, n. 3, p. 259-265, 2005.

LEVITT, J. Responses of plants to environmental stresses. New York: **Academic Press**, 1972. 697 p.

LEVITT, J. Responses of plants to environmental stresses, water, radiation, salt and other stresses. **United Kingdom edition**. 1980.

LIU, Jian-Xiang et al. Salt stress responses in Arabidopsis utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. **The Plant Journal**, v. 51, n. 5, p. 897-909, 2007.

LIU, Qingquan; LUO, Le; ZHENG, Luqing. Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 335, 2018.

LIVINE, A., VAADIA, Y. Water deficits and hormones relations In: KOZLOWSKI (Ed.). **Water deficits and plant growth**. Wisconsin: [s.n.], 1972. v.3, p.258 – 273

MAIA, P. S. P. et al. Conteúdo relativo de água, teor de prolina e carboidratos solúveis totais em folhas de duas cultivares de milho submetidas a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. supl 2, p. 918-920, 2007.

MANSFIELD, J. T, ATKINSON, C.J. **Stomatal behaviour in water stressed plants**. In: Alscher RG, Cumming JR (eds) Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms. Wily-Liss, New York, pp 241–264. 1990.

MARTIN, Luiz Gabriel Pereira et al. Estudo da secagem da polpa de cupuaçu por atomização. 2013.

- MASKIN, Laura et al. Differential expression of the members of the Asr gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Science**, v. 161, n. 4, p. 739-746, 2001.
- MATIC, Sandra et al. Sucrose synthase isoforms in cultured tobacco cells. **Plant physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 299-306, 2004.
- MEDRANO, H. et al. Long term water stress inactivates Rubisco in subterranean clover. **Annals of Applied Biology**, v. 131, n. 3, p. 491-501, 1997.
- MOIN, Mazahar et al. Expression profiling of Ribosomal Protein gene family in dehydration stress responses and characterization of transgenic rice plants overexpressing RPL23A for water-use efficiency and tolerance to drought and salt stresses. **Frontiers in chemistry**, v. 5, p. 97, 2017.
- MONTEIRO, Juliana Geseira et al. Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 18-25, 2014.
- MORAN, Jose F. et al. Drought induces oxidative stress in pea plants. **Planta**, v. 194, n. 3, p. 346-352, 1994.
- MORELL, Matthew; COPELAND, Les. Sucrose synthase of soybean nodules. **Plant Physiology**, v. 78, n. 1, p. 149-154, 1985.
- MUCHOW, R. C. et al. Response of Leaf Growth, Leaf Nitrogen, and Stomatal Conductance to Water Deficits during Vegetative Growth of Field-Grown Soybean 1. **Crop science**, v. 26, n. 6, p. 1190-1195, 1986.
- NAKASHIMA, Kazuo; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko; SHINOZAKI, Kazuo. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 170, 2014.
- NESVIZHSHKII, Alexey I. et al. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646-4658, 2003.
- NOGUEIRA, REJANE J. et al. Modifications in vapor diffusion resistance of leaves and water relations in barbados cherry plants under water stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 1, p. 75-87, 2001.
- OLIVEIRA-NETO, C. F. et al. Estudos ecofisiológicos e bioquímicos do cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Wild. Ex. Spreng.) Schum] submetido ao estresse hídrico e a reidratação. In: **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRA, 2.; SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL (AVALIAÇÃO-2004), 8., 2005, Belém, PA. Ciência e tecnologia com inclusão social: anais. Belém, PA: UFRA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005.

- OLIVEIRA, Alexsandra D. de; FERNANDES, Edemo João; RODRIGUES, Teresinha de JD. Condutância estomática como indicador de estresse hídrico em Feijão. **Engenharia Agrícola**, p. 86-95, 2005.
- OSAKABE, Yuriko et al. Response of plants to water stress. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 86, 2014.
- PAIVA, Auricleia S. et al. Condutância estomática em folhas de feijoeiro submetido a diferentes regimes de irrigação. **Engenharia Agrícola**, p. 161-169, 2005.
- PANDEY, Akhilesh; MANN, Matthias. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 837, 2000.
- PARK, Sang-Youl et al. Agrochemical control of plant water use using engineered abscisic acid receptors. **Nature**, v. 520, n. 7548, p. 545, 2015.
- PATTERSON, Scott D.; AEBERSOLD, Ruedi H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature genetics**, v. 33, p. 311, 2003.
- PENG, Zhenying et al. A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, n. 12, p. 2676-2686, 2009.
- PEREIRA, Jacqueline Wanessa et al. Mudanças bioquímicas em genótipos de amendoim submetidos a déficit hídrico moderado. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 766-773, 2012.
- PÉREZ-DÍAZ, Jorge et al. Organ-and stress-specific expression of the ASR genes in rice. **Plant cell reports**, v. 33, n. 1, p. 61-73, 2014.
- PIMENTEL, Carlos. A relação da planta com a água. **Seropédica: Edur**, 2004.
- PLAXTON, William C. The organization and regulation of plant glycolysis. **Annual review of plant biology**, v. 47, n. 1, p. 185-214, 1996.
- PRASAD, Bishun Deo et al. Heterologous expression and characterization of recombinant OsCDR1, a rice aspartic proteinase involved in disease resistance. **Protein expression and purification**, v. 72, n. 2, p. 169-174, 2010.
- PRASAD, Mular R. Narashima. **Plant ecophysiology**. John Wiley & Sons, 1997.
- QUIRINO, Betania F. et al. Molecular aspects of leaf senescence. **Trends in plant science**, v. 5, n. 7, p. 278-282, 2000.
- QURESHI, M. Irfan; QADIR, S.; ZOLLA, Lello. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. **Journal of plant physiology**, v. 164, n. 10, p. 1239-1260, 2007.

RABELLO, Aline R. et al. Identification of drought-responsive genes in roots of upland rice (*Oryza sativa* L). **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 485, 2008.

RAMANJULU, S.; BARTELS, D. Drought-and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. **Plant, cell & environment**, v. 25, n. 2, p. 141-151, 2002.

READ, J. A. et al. Structural basis for altered activity of M-and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 43, n. 2, p. 175-185, 2001.

RIBEIRO, I. L. A. C. **Proteômica de cana-de-açúcar em condição de estresse hídrico**. 2010. 139 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

RIZHISKY, Ludmila; LIANG, Hongjian; MITTLER, Ron. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. **Plant physiology**, v. 130, n. 3, p. 1143-1151, 2002.

RODRIGUES FERREIRA, Maria das Graças et al. Influência do substrato no crescimento de mudas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 4, 2009.

RODRIGUES, Fabiana Aparecida; DE LAIA, Marcelo Luiz; ZINGARETTI, Sonia Marli. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. **Plant Science**, v. 176, n. 2, p. 286-302, 2009.

ROVEDA-HOYOS, Gabriel; FONSECA-MORENO, Liz P. Proteomics: a tool for the study of plant response to abiotic stress. **Agronomía Colombiana**, v. 29, n. 2, p. 412-422, 2011.

ROY, Sujit. Maintenance of genome stability in plants: repairing DNA double strand breaks and chromatin structure stability. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 487, 2014.

SAHNOUN, Ilhem et al. PPMdb: a plant plasma membrane database. **Journal of biotechnology**, v. 78, n. 3, p. 235-246, 2000.

SAID, M. M. Aspectos culturais e potencial de uso do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng. Schum.) no estado do Amazonas. 2011. 136 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia)–Universidade Federal do Amazonas. UFAM, Manaus, 2011.

SALVUCCI, Michael E. Association of Rubisco activase with chaperonin-60 β : a possible mechanism for protecting photosynthesis during heat stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 7, p. 1923-1933, 2008.

SATO, Yutaka; YOKOYA, Sakiko. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17. 7. **Plant cell reports**, v. 27, n. 2, p. 329-334, 2008.

- SCHAFFER, Arthur A.; PETREIKOV, Marina. Inhibition of fructokinase and sucrose synthase by cytosolic levels of fructose in young tomato fruit undergoing transient starch synthesis. **Physiologia Plantarum**, v. 101, n. 4, p. 800-806, 1997.
- SCHWANZ, Peter; POLLE, Andrea. Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pendunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO₂ concentrations. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 354, p. 133-143, 2001.
- SIGNARBIEUX, Constant; FELLER, Urs. Non-stomatal limitations of photosynthesis in grassland species under artificial drought in the field. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n. 2, p. 192-197, 2011.
- SILVA, A. M da S.; CORRÊA, G. C.; REIS, E. M. Proteômica - Uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde & Ambiente**, v. 2, p. 1-10, 2007.
- SILVA, R. R da et al. Desenvolvimento inicial de plântulas de *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. sob influência de sombreamento. **Acta amazônica**, v. 37, n. 3, p. 365-370, 2007.
- SIMÕES, Isaura; FARO, Carlos. Structure and function of plant aspartic proteinases. **European journal of biochemistry**, v. 271, n. 11, p. 2067-2075, 2004.
- SMEEKENS, Sjef. Sugar regulation of gene expression in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 1, n. 3, p. 230-234, 1998.
- SMIRNOFF, Nicholas. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New phytologist**, v. 125, n. 1, p. 27-58, 1993.
- SOARES, C. K. G. **Efeito do estresse hídrico na expressão de proteínas em duas variedades de soja contrastantes para o conteúdo de óleo e proteína**. 2013. 128 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.
- SOMAL, T. L. C.; YAPA, P. A. J. Accumulation of proline in cowpea under nutrient, drought, and saline stresses. **Journal of plant nutrition**, v. 21, n. 11, p. 2465-2473, 1998.
- SOUZA, A. et al. Boas práticas na colheita e pós-colheita do cupuaçu. **Embrapa Amazônia Ocidental-Circular Técnica (INFOTECA-E)**.
- SOUZA, A. et al. Estudo preliminar da cadeia produtiva do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum) no Amazonas. **EMBRAPA-CPAA. Documentos**, 1999.
- SOUZA, A. et al. Cultivares de cupuaçuzeiro: clones para o Estado do Amazonas: produtividade: resistência à vassoura-de-bruxa. **Embrapa Amazônia Ocidental-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**. 2014.
- SOUZA, A.G.C.S. **Boas práticas agrícolas da cultura do cupuaçuzeiro**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2007.

SU, Pai-Hsiang; LI, Hsou-min. Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. **Plant physiology**, v. 146, n. 3, p. 1231-1241, 2008.

SUNG, Dong Yul; GUY, Charles L. Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in Arabidopsis. Evidence for pleiotropic consequences. **Plant Physiology**, v. 132, n. 2, p. 979-987, 2003.

SZECSI, Pal B. The aspartic proteases. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 52, n. sup210, p. 5-22, 1992.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia do estresse. **Fisiologia vegetal**, v. 4, p. 738-772, 2004.

TEIXEIRA, J. S. S. et al. Prolina, glicina-betaína, açúcares redutores e não redutores em progênies de cupuaçuzeiro submetidas à deficiência hídrica. In: **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS, 2., 2017. Anais...[Sl: sn], 2018.

TIMPERIO, Anna Maria; EGIDI, Maria Giulia; ZOLLA, Lello. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). **Journal of proteomics**, v. 71, n. 4, p. 391-411, 2008.

TOMANEK, Lars. Proteomics to study adaptations in marine organisms to environmental stress. **Journal of proteomics**, v. 105, p. 92-106, 2014.

TOUZET, P. et al. The maize two-dimensional gel protein database: towards an integrated genome analysis program. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, n. 5-6, p. 997-1005, 1996.

UMEZAWA, Taishi et al. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Current opinion in biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 113-122, 2006.

UMEZAWA, Taishi et al. SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in Arabidopsis thaliana. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 49, p. 17306-17311, 2004.

VAN DER STRAETEN, Dominique et al. Plant enolase: gene structure, expression, and evolution. **The Plant Cell**, v. 3, n. 7, p. 719-735, 1991.

VENTURIERI, Georgini Augusto. Capuacu: especie, sua cultura, usos, e processamento. **Belem: Clube do Cupu vii, 108p.-illus., col. illus.. ISBN**, v. 72127, 1993.

VILLAR, Emilie et al. RNA-Seq reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in eucalyptus. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 1, 2011.

VIRLOUVET, Laetitia et al. The ZmASR1 protein influences branched-chain amino acid biosynthesis and maintains kernel yield in maize under water-limited conditions. **Plant**

physiology, p. pp. 111.176818, 2011.

WAN, Xiang-Yuan; LIU, Jin-Yuan. Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, n. 8, p. 1469-1488, 2008.

WANG, Wangxia; VINOCUR, Basia; ALTMAN, Arie. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, n. 1, p. 1-14, 2003.

WANG, Wei et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, v. 27, n. 13, p. 2782-2786, 2006.

WANG, Haiguang; ZHANG, Hongliang; LI, Zichao. Analysis of gene expression profile induced by water stress in upland rice (*Oryza sativa* L. var. IRAT109) seedlings using subtractive expressed sequence tags library. **Journal of integrative plant biology**, v. 49, n. 10, p. 1455-1463, 2007.

WANG, Xiaoli et al. Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 10, p. 1706, 2016.

WRIGHT, P. C. et al. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. **Theriogenology**, v. 77, n. 4, p. 738-765. e52, 2012.

XIA, Yiji et al. An extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis disease resistance signaling. **The EMBO journal**, v. 23, n. 4, p. 980-988, 2004.

XIONG, Liming; SCHUMAKER, Karen S.; ZHU, Jian-Kang. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **The plant cell**, v. 14, n. suppl 1, p. S165-S183, 2002.

XU, Chenping; HUANG, Bingru. Differential proteomic response to heat stress in thermal *Agrostis scabra* and heat-sensitive *Agrostis stolonifera*. **Physiologia plantarum**, v. 139, n. 2, p. 192-204, 2010.

XU, Jing et al. Transgenic Arabidopsis plants expressing tomato glutathione S-transferase showed enhanced resistance to salt and drought stress. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0136960, 2015.

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

YANG, Chin-Ying et al. A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 139, n. 2, p. 836-846, 2005.

YANG, L. et al. Differential expression of cell wall related genes in the elongation zone of rice roots under water deficit. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 53, n. 3, p. 390-395, 2006.

YAO, Xuan et al. Overexpression of the aspartic protease ASPG1 gene confers drought avoidance in Arabidopsis. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 7, p. 2579-2593, 2012.

YE, Tiantian et al. Contrasting proteomic and metabolomic responses of bermudagrass to drought and salt stresses. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1694, 2016.

ZADRAŽNIK, Tanja et al. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of proteomics**, v. 78, p. 254-272, 2013.

ZANETTI, Leonardo Valandro et al. Leaf application of silicon in young cacao plants subjected to water deficit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 3, p. 215-223, 2016.

ZHANG, Cuimei; SHI, Shangli. Physiological and Proteomic Responses of Contrasting Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Varieties to PEG-Induced Osmotic Stress. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 242, 2018.

ZHENG, Yuan et al. The glycosyltransferase QUA1 regulates chloroplast-associated calcium signaling during salt and drought stress in Arabidopsis. **Plant and Cell Physiology**, v. 58, n. 2, p. 329-341, 2016.