

Documentos

ISSN 1983-974X
Setembro, 2007

165

Aplicações da Proteômica na Pesquisa Vegetal



ISSN 1983-974X
Setembro, 2007

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 165

Aplicações da Proteômica na Pesquisa Vegetal

Karem Guimarães Xavier Meireles

Embrapa Gado de Corte
Campo Grande, MS
2007

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Rodovia BR 262, Km 4, CEP 79002-970 Campo Grande, MS
Caixa Postal 154
Fone: (67) 3368 2083
Fax: (67) 3368 2180
<http://www.cnpgc.embrapa.br>
E-mail: publicacoes@cnpgc.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Cleber Oliveira Soares*

Secretário-Executivo: *Wilson Werner Koller*

Membros: *Antonio do Nascimento Rosa, Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima, Geraldo Augusto de Melo Filho, Gracia Maria Soares Rosinha, Lúcia Gatto, Manuel Antônio Chagas Jacinto, Maria Antonia Martins de Ulhôa Cintra, Tênisson Waldow de Souza, Wilson Werner Koller*

Supervisão editorial: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

Revisão de texto: *Lúcia Helena Paula do Canto*

Normalização bibliográfica: *Maria Antonia M. de Ulhôa Cintra*

Editoração eletrônica e Tratamento de ilustrações: *Ecila Carolina N. Z. Lima*

Foto da capa: *Arquivo Embrapa Gado de Corte*

1^a edição

1^a impressão (2007): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Gado de Corte.

Meireles, Karem Guimarães Xavier.

Aplicações da proteômica na pesquisa vegetal / Karem Guimarães Xavier Meireles -- Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2007.

38 p. ; 21 cm. -- (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-974X ; 165).

1. Proteína. 2. Proteômica. 3. Proteoma. 4. Genética vetetal. 5. Pesquisa. I. Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS). II. Título. III. Série.

CDD 572.6 (21.ed.)

© Embrapa Gado de Corte 2007

Autores

Karem Guimarães Xavier Meireles

Engenheira Florestal, D.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS,
karem@cnpgc.embrapa.br

Sumário

Resumo	7
Abstract.....	9
Introdução	10
Metodologias proteómicas	11
Proteómica de plantas	14
Estresses abióticos	16
Estresses bióticos	20
Integração da proteómica ao melhoramento genético	23
Biologia de sistemas.....	25
Referências	26

Aplicações da Proteômica na Pesquisa Vegetal

Karem Guimarães Xavier Meireles

Resumo

A Proteômica surgiu como uma das vertentes da era pós-genômica e vem contribuindo significativamente para o entendimento global e integrado do sistema biológico. O estudo do proteoma envolve todo o conjunto de proteínas expresso pelo genoma de uma célula, como também pode ser direcionado somente àquelas que se expressam diferencialmente em condições específicas. Proteômica dedica-se também ao conjunto de isoformas de proteínas e modificações pós-traducionais, às interações entre elas, bem como à descrição estrutural de moléculas e seus complexos. Esta revisão apresenta as principais tecnologias empregadas em estudos proteômicos, e faz um levantamento de trabalhos recentes que utilizaram abordagens proteômicas para a identificação de genes e rotas envolvidos na resposta da planta a estresses bióticos e abióticos. Finalmente, são discutidos aspectos do potencial do emprego da proteômica na compreensão de questões biológicas complexas e no melhoramento genético de plantas na busca de genótipos superiores.

Termos para indexação: proteoma, gel 2D, espectrometria de massa, estresse biótico, estresse abiótico, genética vegetal.

Applications of Proteomics in Plant Research

Abstract

Proteomics appeared as one of the sciences of the post-genomic era and begins to contribute significantly for the global and integrated understanding of biological systems. The study of proteome involves the whole set of proteins expressed by the genome of a cell, or may be directed to only that part which expresses differentially under specific conditions. Proteomics also refers to the set of isoforms of proteins and modifications post-translation, to the interactions between them, as well as to the structural description of molecules and their complexes. This review presents the main technologies used in proteomic studies, and surveys the recent literature that used proteomics for the identification of genes and pathways involved in the response of plants to biotic and abiotic stresses. Finally, aspects of the potential use of proteomics for the understanding of complex biological questions and for genetic improvement of plants aiming at superior genotypes are discussed.

Index terms: proteome, 2D gel, mass spectrometry, biotic stress, abiotic stress, plant genetics.

Introdução

O termo “proteoma” surgiu em 1994, para designar o conjunto de proteínas expresso pelo genoma de uma célula, em um determinado ambiente (ANDERSEN; ANDERSEN, 1996; WILKINS et al., 1995). A proteômica despontou como uma das vertentes da era pós-genômica, como resultado direto dos avanços conseguidos pelo seqüenciamento em larga escala de ácido desoxirribonucléico (DNA) (PANDEY; MANN, 2000). Percebeu-se que o acúmulo de grande quantidade de seqüências nos bancos de dados não é suficiente para elucidar a função biológica. A existência de uma *open reading frame* (ORF) nos dados genômicos não implica, necessariamente, a existência de um gene funcional, revelando a dificuldade de predizer genes a partir de dados genômicos (DUNHAM et al., 1999; EISENBERG et al., 2000). A confiabilidade das ORFs preditas é considerada baixa, especialmente para genes pequenos ou genes com pouca ou nenhuma homologia com genes conhecidos (CASH, 1998), sendo importante a confirmação de um produto gênico por meio da análise proteômica.

O objetivo maior das abordagens proteômicas é contribuir para o entendimento global e integrado da biologia da célula, uma vez que muitas informações não podem ser obtidas apenas a partir do estudo dos genes. As proteínas são os agentes definitivamente responsáveis pelos fenótipos das células, e, em função disso, torna-se impossível elucidar processos, como mecanismos de doença, envelhecimento e os efeitos do ambiente, somente pelo estudo dos genes (GRAVES; HAYSTEAD, 2002). Com efeito, a proteômica dedica-se ao estudo das propriedades das proteínas, seus níveis de expressão, funções, modificações pós-tradicionais, interações entre proteínas e mecanismos regulatórios (BLACKSTOCK; WEIR, 1999). A descrição do proteoma de uma célula ou tecido fornece não apenas um catálogo do conjunto de proteínas que está sendo expresso pelo genoma, mas também dados de expressão celular sob condições específicas e a localização dessas moléculas na célula (CASH, 1998).

Os estudos proteômicos estão muito avançados em determinadas áreas de pesquisa, como na medicina, para o estudo do câncer humano

(WULFKUHLE et al., 2004) e para a identificação de biomarcadores visando ao diagnóstico precoce de doenças (CHIGNARD; BERETTA, 2004). Na indústria farmacêutica, os objetivos são o desenvolvimento de novas drogas e a caracterização de novos alvos farmacológicos. Relativamente, a proteômica de plantas encontra-se ainda em sua fase inicial, e seu potencial de predição está longe de ser totalmente explorado pela pesquisa na área vegetal. A proteômica está gerando dados inéditos, bem como validando, complementando e até corrigindo informações obtidas por outras abordagens, contribuindo, assim, para um maior entendimento da biologia das plantas.

Metodologias proteômicas

No passado, a proteômica estava normalmente associada à exposição de um grande número de proteínas de uma célula ou organismo em géis bidimensionais. Nesse sentido, os primeiros estudos que podem ser incluídos em proteômica datam dos anos de 1970, quando pesquisadores iniciaram o mapeamento de proteínas de alguns organismos e construíram os primeiros bancos de dados de proteínas (O'FARREL, 1975; KLOSE, 1975; SCHEELE, 1975).

Embora muitas delas pudessem ser isoladas e visualizadas em géis, elas não podiam ser identificadas, pois não havia uma tecnologia de seqüenciamento suficientemente sensível. Nesse sentido, o primeiro método desenvolvido foi o seqüenciamento de Edman, que consiste na leitura dos aminoácidos da extremidade N-terminal da proteína (EDMAN, 1949). Esse método foi e ainda é amplamente utilizado para identificar proteínas, após a transferência dessas para membranas de *polyvinylidene fluoride* (PVDF) (AEBERSOLD et al., 1986). Entretanto, existe uma grande limitação no emprego da química de Edman para o seqüenciamento de proteínas – a leitura dos aminoácidos só pode ser efetuada se a extremidade N-terminal da proteína estiver livre. No entanto, estima-se que 50% a 70% das proteínas apresentam sua extremidade bloqueada, como resultado de modificações sofridas durante sua purificação (HENZEL et al., 1993).

Atualmente, a proteômica envolve a análise funcional dos produtos gênicos ou “genômica funcional”, incluindo a identificação em larga escala, localização e compartimentalização das proteínas, e estudos de redes de interação de proteínas (AEBERSOLD; MANN, 2003). A abertura a essas linhas de pesquisa só foi possível a partir do final dos anos de 1980, com o desenvolvimento da espectrometria de massa de biomoléculas. Essa tecnologia substituiu o método de degradação de Edman, porque é muito mais sensível e é capaz de fragmentar peptídeos em segundos, ao invés de horas ou dias (WILM; MANN, 1996). Além disso, a espectrometria de massa não exige a purificação prévia de proteínas ou peptídeos por cromatografia líquida nem apresenta problemas na identificação de proteínas com extremidades bloqueadas ou modificadas (STEEN; MANN, 2004). Os grandes avanços trazidos pelo desenvolvimento dos métodos de ionização branda, como a ionização por *eletrospray* (FENN et al., 1989) e a ionização MALDI (KARAS; HILLENKAMP, 1988), foram determinantes no estabelecimento da espectrometria de massa, não somente como uma ferramenta atual para determinar a estrutura primária das proteínas, mas também como a tecnologia central no campo da proteômica.

Os espectrômetros de massa são constituídos, basicamente, de três elementos: a) uma fonte de ionização, que promove a ionização dos peptídeos e transfere esses fons da solução, onde se encontram, para a fase gasosa; b) um ou mais analisadores de massa, os quais separam os íons de acordo com suas massas e cargas; e c) um detector, cuja função é contabilizar e registrar todos os íons que chegam até ele (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

Os espectrômetros disponíveis no mercado são combinações das diversas estratégias de fontes de ionização e analisadores de massa. Normalmente, esses equipamentos oferecem dois tipos de análise de proteínas - *mass fingerprinting* e *tandem mass spectrometry*.

Na análise *mass fingerprinting*, os valores de massa/carga dos peptídeos individuais de uma mistura são mensurados e convertidos em valores de

massa que, dispostos em uma ordem determinada e única, correspondem aos peptídeos que compõem a proteína (BURLINGAME et al., 1998). A “impressão digital” das massas determinadas pelo espectrômetro é, então, comparada às massas dos peptídeos geradas pela digestão hipotética de cada proteína do banco de dados, levando à identificação da proteína (BALDWIN, 2004). Essa abordagem permite identificar e caracterizar proteínas em larga escala, tendo sido desenvolvida por Henzel et al. (1993) e imediatamente difundida e utilizada mundialmente em laboratórios (PORUBLEVA et al., 2001; KERIM et al., 2003; RENAUT et al., 2004).

A análise *tandem mass spectrometry* permite obter a seqüência dos aminoácidos que constituem uma proteína, em dois passos: no primeiro, todos os peptídeos da amostra são separados pelos analisadores de massa, gerando um espectro relacionando os valores de massa/carga x intensidade dos íons, e, no segundo, apenas o íon de interesse é selecionado e fragmentado por colisão com um gás inerte, resultando em um novo espectro, onde a diferença entre dois íons adjacentes corresponde, em massa, a um aminoácido (AEBERSOLD; MANN, 2003). Tal abordagem foi primeiramente utilizada por Shevchenko et al. (1996), para identificar proteínas em *Escherichia coli*, e, desde então, tem sido amplamente empregada em estudos proteômicos de diferentes organismos.

Embora a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massa permaneçam como as tecnologias centrais da proteômica, novas metodologias, desenvolvidas inicialmente em levedura e mamíferos, estão começando a ser aplicadas em plantas para estudos específicos (MAOR et al., 2007; McDONALD et al., 2006; MANN, 2006). Entre as técnicas proteômicas da chamada “segunda geração”, as Difference Gel Electrophoresis (DIGE) e Multi-dimensional Protein Identification Technology (MudPIT) são empregadas na separação de proteínas de uma mistura complexa, enquanto que as Stable Isotopic Labeling using Amino Acids in Cell Culture (SILAC), Isotope Coded Affinity Tag (ICAT) e Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) baseiam-se na marcação com isótopos para quantificação de moléculas por espectrometria de massa.

Proteômica de plantas

Enquanto a pesquisa proteômica encontra-se bastante desenvolvida em humanos e microorganismos-modelo, como *Escherichia coli* e levedura (FOSTER et al., 2006; GODOY et al, 2006), o estudo dos proteomas de plantas dá seus primeiros passos. Uma busca realizada no ISI Web of Knowledge revelou que no ano de 2007 foram registrados 227 artigos sobre proteômica de plantas, ao passo que em 2006 foi publicado um total de 154 documentos (JORRIN et al., 2007) na mesma área. Isto mostra que, aos poucos, as tecnologias proteômicas vêm conquistando espaço nos laboratórios que trabalham com biologia de plantas, pois apresentam grande potencial de serem exploradas nesse campo.

A maioria dos estudos vem sendo desenvolvida em *Arabidopsis*, arroz e trigo. *Oryza sativa* (arroz) é considerada uma espécie-modelo para pesquisas em genética e biologia molecular, pois os genomas de gramíneas compartilham um elevado grau de sintenia (DEVOS; GALE, 2000). O mapeamento de proteínas de arroz e trigo alcançaram avanços significativos por causa da disponibilização pública das seqüências de DNA genômico e de *Expressed sequence tag* (ESTs) dessas espécies, facilitando a identificação das moléculas por espectrometria de massa. Para as demais espécies analisadas, ainda sem um número razoável de seqüências genômicas decifradas, a porcentagem de proteínas conhecidas é, via de regra, muito inferior.

Os mapas de proteínas vêm sendo gerados a partir da análise proteômica de diversos tecidos e órgãos das plantas, como folhas, raízes, sementes, anteras e caules. Grandes esforços também têm sido notados na caracterização dos proteomas de diversas organelas, especialmente cloroplastos e mitocôndrias (MARTINOIA et al., 2007; LUNN, 2007; MACHEREL et al., 2007; RADHAMONY; THEG, 2006).

A proteômica de plantas vem assumindo um papel cada vez maior em várias frentes da pesquisa, agregando às metodologias convencionais

informações inéditas e diferenciadas sobre a questão biológica estudada, que até então não podiam ser acessadas.

Ruebelt et al. (2006a, 2006b, 2006c) investigaram alterações nos proteomas de culturas geneticamente modificadas (GMs), demonstrando o grande potencial da proteômica para avaliar a segurança de alimentos e forragens transgênicos. Atualmente, a análise da segurança alimentar de uma cultura transgênica consiste na comparação entre a cultura GM e a original (não-GM), por meio de avaliações das características agronômicas/fenotípicas, estudos sobre o desempenho do alimento e determinação dos teores de micro e macronutrientes da cultura (CELLINI et al., 2004). A incorporação da análise proteômica, como uma etapa importante da avaliação da segurança alimentar de transgênicos, permite a comparação de milhares de componentes da espécie analisada, sem a necessidade de se conhecer previamente sua identidade, favorecendo a identificação de efeitos não pretendidos resultantes da modificação genética.

A identificação de proteínas alergênicas em espécies vegetais, importantes para a alimentação humana, é também um campo de atuação importante da proteômica (HERNDL et al., 2007; KITTA et al., 2006; PETERSEN et al., 2006; KARLSSON et al., 2004). Nessa estratégia, proteínas totais da planta são solubilizadas em uréia e detergente de força não-iônica, e separadas por eletroforese bidimensional. Em seguida, as moléculas reativas ao anticorpo são detectadas por *imunoblotting* usando soro de pacientes alérgicos. Finalmente, as proteínas alergênicas candidatas são facilmente identificadas por meio de degradação sítio-específica e espectrometria de massa (AKAGAWA et al., 2007).

Outra área de muito interesse da proteômica vegetal refere-se à caracterização de modificações pós-tradicionais, essenciais para que as proteínas cumpram seus papéis nos mais diversos eventos celulares. Estima-se que ocorram cerca de 300 tipos de modificações pós-tradicionais (PTMs) distintas (SALEKDEH; KOMATSU, 2007), entretanto, os estudos em plantas estão ainda limitados a poucas PTMs (MAOR et al., 2007; GHESQUIERE et al., 2006). Até o momento, a fosforilação é a PTM mais investigada (ROSSIGNOL, 2006; LAUGESEN et al., 2006; OLSEN et al.,

2006), por ser responsável pela regulação das funções das proteínas, incluindo localização subcelular, estabilidade, formação de complexos e atividade por meio de diferentes mecanismos (REINDERS; SICKMANN, 2005; TETLOW et al., 2004).

Diversos aspectos da biologia das plantas vêm sendo investigados por meio de abordagens proteômicas em genótipos selvagens, mutantes e transgênicos, submetidos a diferentes condições de estresses ambientais, como também em interação com patógenos e pragas, ou ainda, em resposta a hormônios e moléculas de sinalização (CHEN et al., 2006; MICHE et al., 2006). Nesta revisão, serão enfatizados estudos proteômicos de plantas sob estresses bióticos e abióticos.

Estresses abióticos

A maioria dos estudos proteômicos concentra-se na avaliação das respostas de espécies vegetais, especialmente o arroz, ao estresse causado pelo sal, calor, frio e seca, que são os principais fatores limitantes ao crescimento e desenvolvimento normal da planta. Outros estresses ambientais simulados sobre plantas para a caracterização proteômica incluem metais pesados, toxicidade mineral e alagamento. Os trabalhos mais recentes realizados nesse campo são apresentados na Tabela 1.

A estratégia utilizada em tais estudos consiste na análise comparativa de materiais genéticos contrastantes de uma mesma espécie para um determinado fator abiótico. Os proteomas de um genótipo tolerante e de outro suscetível, submetidos às mesmas condições de estresse, são separados por eletroforese bidimensional e contrastados por um programa de análise computacional, possibilitando, assim, identificar possíveis alterações significativas nos níveis de proteínas contra um fundo de moléculas não responsivas ao estresse. Finalmente, as moléculas de interesse, ou seja, aquelas que respondem ao estresse por meio de expressão diferenciada, são identificadas por espectrometria de massa.

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

Tabela 1. Estudos proteômicos sobre os efeitos de estresses abióticos em plantas.

Planta	Tecido amostrado	Abordagem proteômica	PR	Referência
Estresse por seca				
Trigo	semente	2DE MALDI-TOF-TOF	121	Hajheidari et al., 2007
<i>Medicago truncatula</i>	nódulos da raiz	FPLC LC-MS-MS	377	Larrañzar et al., 2007
<i>Cicer arietinum</i>	matriz extracelular	2DE HPLC/Q-STAR	134	Bhushan et al., 2007
Milho	raiz	2DE Q-TOF	229	Zhu et al., 2007
<i>Elymus elongatum</i>	folha	2DE LC-MS/MS	58	Gazanchian et al., 2007
<i>Xerophyta viscosa</i>	raiz	2DE MALDI-TOF	54	Ingle et al., 2007
Arroz	bainha da folha	2DE seqüenciamento	12	Ali e Komatsu, 2006
Estresse por calor				
Arroz	folha	2DE MALDI-TOF-TOF	73	Lee et al., 2007(a)
Arroz	grão	2DE Ion trap MS-MS	7	Lin et al., 2005
Trigo	grão maduro	2DE MALDI-TOF	43	Majoul et al., 2004

Continua...

Tabela 1. Continuação

Planta	Tecido amostrado	Abordagem proteômica	PR	Referência
Estresse por frio				
<i>Jatropha curcas</i>	folha	2DE LC-MS/MS	8	Liang et al., 2007
Arroz	folha	2DE MALDI-TOF ESI-MS/MS	18	Lee et al., 2007(a)
Arroz	antera micrósporo	2DE MALDI-TOF Q-TOF	37	Imin et al., 2006
Arroz	folha	2DE MALDI-TOF- TOF	96	Yan et al., 2006
Estresse por sal				
Trigo (<i>Triticum aestivum</i> e <i>T. durum</i>)	folha	2DE	74	Yıldız, 2007
Arroz	broto	2DE MALDI-TOF- TOF	24	Malakshah et al., 2007
<i>Arabidopsis thaliana</i>	raiz	2DE LC-MS/MS	215	Jiang et al., 2007
Tomate	folha raiz	SDS-PAGE 2DE MALDI-TOF	23	Amini et al., 2007
Arroz	folha	2DE MALDI-TOF	15	Zang e Komatsu, 2007
Banana	broto	2DE seqüenciamento	17	Carpentier et al., 2007
Estresse por alagamento				
Tomate	folha	2DE MALDI-TOF ESI-MS/MS	52	Ahsan et al., 2007(a)
Tomate	raiz	2DE MALDI-TOF	35	Ahsan et al., 2007(b)
Estresse por ozônio				
Feijão	folha	2DE	25	Torres et al., 2007
Milho		seqüenciamento	12	
Arroz	folha	2DE seqüenciamento	52	Agrawal et al., 2002

Continua...

Tabela 1. Continuação

Planta	Tecido amostrado	Abordagem proteômica	PR	Referência
Estresse por toxicidade mineral				
Alumínio				
Arroz	raiz	2DE seqüenciamento	17	Yang et al., 2007(b)
Boro				
Cevada	folha	Marcação iTRAQ LC-MS/MS	138	Patterson et al., 2007
Estresse por sombreamento				
Tomate	folha	2DE nanoflow HPLC-tandem MS	59	Hattrup et al., 2007
Estresse por luz				
Arroz	folha	2DE MALDI-TOF	52	Yang et al., 2007(a)
Estresse por metal pesado - cádmio				
Arroz	semente	2DE MALDI-TOF	27	Ahsan et al., 2007(c)
Arroz	raiz	2DE MALDI-TOF	30	Aina et al., 2007
<i>Lepidium sativum</i>	folha semente	2DE MALDI-TOF Q-TOF	42	Gianazza et al., 2007
Múltiplos estresses				
Seca e sal				
<i>Arabidopsis thaliana</i>	folha	2DE MALDI-TOF	34	Kim et al., 2007
Uva	brot o	2DE MALDI-TOF-TOF	191	Vincent et al., 2007
Deficiência de P e toxicidade por Al				
Arroz	raiz	2DE TOF/MS Edman	94 3	Fukuda et al., 2007

PR: número de proteínas envolvidas na resposta ao estresse; 2DE: técnica de eletroforese que separa proteínas em duas dimensões - por meio de seus pontos isoeletéricos e pesos moleculares; SDS-PAGE: técnica de eletroforese que separa proteínas somente por meio de seus pesos moleculares; ESI: ionização por *eletrospray*; MALDI: ionização/dessorção de matriz assistida por laser; LC: cromatografia líquida;

iTRAQ: método de quantificação de proteínas por meio de marcação radioativa; HPLC: cromatografia líquida de alta *performance*; FPLC: tipo de cromatografia líquida que separa proteínas a partir de uma mistura complexa; MS/MS: análise por espectrometria de massa em seqüência; TOF: analisador das massas dos peptídeos; MALDI-TOF-TOF, Q-STAR, Q-TOF, *ion trap*: tipos de espectrômetros de massa que realizam as análises das amostras de proteínas.

Entretanto, um determinado tecido da planta pode responder mais diretamente a um estresse específico e, por essa razão, sua amostragem deve ser priorizada para a análise proteômica. Por exemplo, entende-se que a raiz é o tecido vegetal mais importante na percepção e resposta ao estresse hídrico. No entanto, dentre os trabalhos realizados com plantas sob seca e alagamento (Tabela 1), apenas alguns analisaram os mecanismos de tolerância ao estresse nas raízes. É necessário concentrar esforços na etapa de planejamento dos experimentos, com vistas a explorar ao máximo as respostas da planta a um fator ambiental por meio de seus proteomas.

Estresses bióticos

As doenças de plantas são estresses de origem biótica, causados por patógenos como fungos, bactérias, nematóides e vírus. Mesmo com o conhecimento avançado sobre patógenos de espécies de importância econômica cultivadas no mundo, bem como seus métodos de controle, perdas significativas no campo são registradas em função da ocorrência de doenças. Os prejuízos às culturas na América do Sul, causados por patógenos, chegam a 46%, enquanto aqueles causados por insetos totalizam 30% (CRAMER, 1967 citado por BERGAMIN FILHO et al., 1995, p. 15).

Ainda não há informações detalhadas sobre como se estabelece, na celular, a interação entre culturas agronômicas e florestais e seus principais patógenos e pragas.

Um estudo sobre as proteínas de *Oryza sativa*, que respondem ao estresse causado pelo vírus da mancha-amarela do arroz (RYMV), foi realizado por Ventelon-Debout et al. (2004). Os proteomas de células em suspensão de uma cultivar parcialmente resistente e outra suscetível foram analisados após uma hora, 2, 5 e 7 dias da inoculação com o vírus, assim como os

complementos protéicos de células não infectadas. Os autores verificaram que as proteínas de arroz reguladas pela rota de resposta ao estresse foram ativadas pelo RYMV em ambas as cultivares, e estão envolvidas no metabolismo, tradução e defesa da planta.

Uma abordagem proteômica foi utilizada para investigar o mecanismo molecular da interação entre *Triticum aestivum* e *Fusarium graminearum* (ZHOU et al., 2006). Espiguetas de uma cultivar de trigo sensível a *F. graminearum* foram inoculadas com esporos do fungo. Cerca de 1.380 spots de proteínas foram separados em géis 2D, dos quais 41 se mostraram diferencialmente expressos por causa da infecção pelo patógeno. A análise por espectrometria de massa revelou que essas proteínas desempenham papéis em diversos processos biológicos, incluindo transdução de sinais, transporte de elétrons, fotossíntese e metabolismo. Além disso, foram identificadas oito proteínas do fungo, cujas prováveis funções estão relacionadas à aquisição de carbono do trigo por meio da rota da glicólise, em uma interação compatível entre o trigo e o patógeno. Em relação à localização subcelular das proteínas envolvidas na resposta da planta ao fungo, o estudo revelou que o cloroplasto é uma das organelas mais afetadas pela infecção por *F. graminearum*.

Sharma et al. (2007) avaliaram os efeitos da infecção causada por *Alternaria brassicae* no proteoma das folhas de duas linhagens de *Brassica napus*. Plantas de linhagens tolerante e suscetível a *A. brassicae* infectadas e sadias (controle) foram analisadas às 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação. A análise do proteoma da linhagem tolerante revelou que 48 spots de proteínas apresentaram alterações em sua expressão ao longo do processo de infecção, com maior número de spots responsivos detectados às 48 horas após inoculação. No caso da linhagem suscetível a *A. brassicae*, 23 spots mostraram alterações em resposta ao patógeno, sendo a maioria das proteínas envolvidas na resposta ao fungo também observada no período de 48 horas após a infecção. Essas moléculas são enzimas que atuam na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), na detoxificação, e nas respostas ao fitohormônio auxina. Os autores encontraram, na linhagem tolerante inoculada com o patógeno, uma proteína

similar à *nucleoside diphosphate kinase* (NDPK) de *Arabidopsis thaliana* em níveis aumentados, juntamente com níveis elevados de enzimas detoxificantes de ROS, sugerindo que a sinalização mediada por ROS envolvendo NPDK pode exercer um papel importante na tolerância de *B. napus* a *A. brassicæ*.

Chen et al. (2007) compararam os proteomas do endosperma de *Zea mays*, de cinco genótipos resistentes e outros cinco suscetíveis a *Aspergillus flavus*, um fungo patogênico que produz substâncias tóxicas a homens e animais ao ingerirem alimentos contaminados. Utilizando técnicas proteômicas, os autores identificaram dez proteínas de milho associadas à resistência ao fungo. Dentre elas, o gene que codifica a *stress-related peroxiredoxin antioxidant* (PER1) foi clonado e superexpresso em *Escherichia coli*. Foi demonstrado que a atividade da PER1 é expressivamente superior no genótipo resistente, como também significativamente induzida ao longo da infecção por *A. flavus*, sugerindo que essa proteína tem um importante papel no aumento da resistência ao estresse.

Recentemente, a Embrapa Gado de Corte integrou a pesquisa em proteômica vegetal ao programa de melhoramento genético de gramíneas forrageiras. No Brasil, as gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* sp. ocupam extensas áreas de cultivo e se caracterizam como a principal fonte de alimento do rebanho bovino. O principal estresse biótico enfrentando pelas cultivares de *Brachiaria* são as cigarrinhas-das-pastagens, insetos sugadores de seiva, cuja alimentação pode determinar danos severos e até mesmo a necrose da parte aérea da planta, comprometendo a produção e a qualidade da pastagem (VALÉRIO, 1989). Apesar do impacto econômico causado pelas cigarrinhas-das-pastagens sobre regiões onde a atividade principal é a bovinocultura de corte, estudos entomológicos são restritos ao conhecimento da bioecologia do inseto e dos danos causados (VALÉRIO, 1989; VALÉRIO; NAKANO, 1992; PIRES et al., 1993).

Ainda não há informações sobre o mecanismo molecular das interações entre as gramíneas forrageiras tropicais e sua principal praga. Em função disso, encontra-se em andamento na Embrapa Gado de Corte, um estudo

proteômico que tem como objetivo investigar em materiais genéticos de *B. brizantha*, resistente e suscetível à cigarrinha-das-pastagens *Notozulia enteriana*, proteínas envolvidas na resposta da planta ao estresse.

Integração da proteômica ao melhoramento genético

O objetivo maior do melhoramento genético de plantas é descobrir e testar novos acessos de germoplasma, desenvolver novas cultivares e variedades de culturas economicamente importantes, com vistas a garantir o suprimento de alimento nas próximas décadas. Lidskog (2005) estima que a população mundial será de 8 bilhões de pessoas dentro de vinte anos, sendo necessário produzir o dobro de alimentos para alimentá-la. Além disso, é preciso considerar as alterações climáticas que já estão ocorrendo no planeta, com tendência de agravamento nos próximos anos, o que leva à necessidade premente de desenvolver materiais genéticos adaptados ao frio, calor ou à seca.

Com efeito, o uso do melhoramento genético para selecionar genótipos adaptados a fatores ambientais é uma estratégia importante e viável, desde que não seja uma ação isolada, pois, de acordo com Salekdeh e Komatsu (2007), o melhoramento genético para estresses ambientais pode ser um processo lento e ineficiente considerando-se a variabilidade do estresse, em termos de seu tempo de duração durante o ciclo de crescimento da planta, e a alta sensibilidade dos fenótipos às diversas condições ambientais, como tipo, textura e química do solo, sendo difícil integrar as correlações genótipo-ambiente em um mesmo experimento.

Da mesma forma, estudos sobre uma questão biológica de uma determinada cultura, desenvolvidos por meio de tecnologias ômicas e dissociados de um programa de melhoramento estabelecido para essa cultura, implicam resultados ineficazes e sem aplicação prática na seleção de problemas concretos.

Pesquisas sobre os efeitos dos mais diferentes tipos de estresse realizadas em plantas-modelo e culturas agronômicas importantes, como arroz e milho, são vislumbradas com grande aplicabilidade em programas de melhoramento de tolerância a algum estresse. Salekdeh e Komatsu (2007) discutem amplamente como a proteômica pode ser integrada com sucesso ao melhoramento genético tradicional de culturas de importância econômica.

O objetivo de se compararem genótipos contrastantes para um determinado tipo de estresse é identificar as proteínas que respondem ao estresse por meio de alterações em seus níveis de expressão. A identificação dessas moléculas e suas respectivas funções permitirá direcionar o trabalho, que deverá ter continuidade somente com aquelas que desempenham papéis relacionados com a característica de tolerância ao estresse.

Para tanto, é essencial cruzar os dados proteômicos com informações também levantadas pela genômica, transcritômica e metabolômica (Fig. 1), a fim de verificar a correlação das proteínas candidatas com a característica desejada. A etapa seguinte visa a avaliar essas proteínas (genes) quanto a sua segregação para a característica de interesse ou loco de caráter quantitativo (QTL), ou seja, determinar o quanto cada uma delas contribui para a característica de tolerância. Finalmente, os genes selecionados poderão ser integrados no melhoramento assistido por marcadores (MAS) ou em programas de transformação genética.

O emprego da seleção MAS em programas de melhoramento tem se revelado uma técnica eficiente para aumentar a tolerância ao estresse. Apresenta como vantagem a possibilidade de ser aplicada de duas a três vezes ao ano, mesmo na ausência do estresse. O mapeamento de QTLs para tal característica é realizado em populações segregantes, e baseia-se na genotipagem da progénie derivada de um cruzamento entre materiais distintos para um determinado tipo de estresse. Os valores fenotípicos para o caráter de interesse são comparados com os genótipos marcadores moleculares da progénie, em busca de regiões genômicas específicas que mostrem associações estatisticamente significativas com a variação da característica, chamada de QTL (SLATE, 2005).

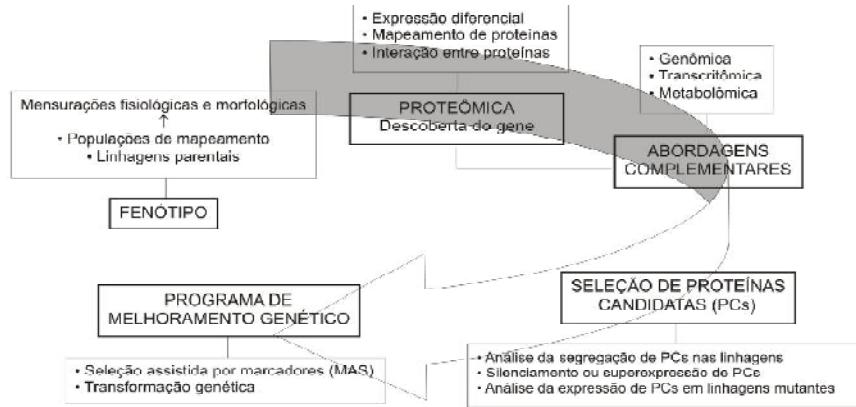


Fig. 1. Integração dos dados gerados pelas tecnologias ômicas ao melhoramento tradicional, visando ao desenvolvimento de novos materiais genéticos (SALEKDEH; KOMATSU, 2007).

Da mesma forma, a utilização da abordagem proteômica para avaliar respostas da planta ao estresse deve ser priorizada em linhagens parentais suscetível e tolerante ao estresse, das quais populações de mapeamento já tenham sido preparadas (SALEKDEH; KOMATSU, 2007). Em plantas, o uso de populações “imortais” de mapeamento consistindo de genótipos homozigotos é vantajoso, pois permite replicações e análises sucessivas da mesma população. Tais populações podem ser obtidas mais comumente por autofecundações sucessivas, como linhagens recombinantes melhoradas (RILs), por repetidos retrocruzamentos como linhagens quase isogênicas (NILs), ou ainda, por duplicação cromossomal induzida, tais como os duplos haplóides (DHs) (KEURENTJES et al., 2007).

Biologia de sistemas

A análise global da expressão do gene, da função da proteína e dos perfis metabólicos tem revelado novas propriedades dos sistemas biológicos (IDEKER et al., 2001). A combinação desses dados em uma rede totalmente integrada propiciará o amplo conhecimento das vias metabólicas e regulatórias desses sistemas (Fig. 1).

O conceito da abordagem “biologia de sistemas” está relacionado ao estudo das interações entre os dados de fisiologia, genômica, proteômica e metabolômica, permitindo, assim, a construção de um modelo que representa e simule a fisiologia de todo o sistema e que explique a forma e a função dos organismos vivos (GUTIERREZ et al., 2005). O objetivo principal dessa abordagem é obter uma visão holística de um organismo vivo, de tal maneira que as respostas dos elementos desse sistema a qualquer tipo de estresse possam ser precisamente previdas (ROSSIGNOL et al., 2006).

Os dados resultantes dos efeitos das alterações ambientais sobre as plantas, coletados pela “biologia de sistemas”, são integrados e conciliados com modelos anteriores, possibilitando a descrição do sistema estudado. De acordo com Salekdeh e Komatsu (2007), as discrepâncias entre os dados observados e o modelo (dados esperados) são utilizadas para definir novos experimentos, considerando novos estresses, tratamentos, tecidos e materiais genéticos, que serão analisados por meio de mensurações sistemáticas. Dessa maneira, o processo deve ser continuamente reavaliado, até que o modelo e os dados observados sejam muito próximos. A informação derivada da abordagem “biologia de sistemas” poderá ser aplicada ao melhoramento genético por meio de MAS ou por transformação genética para aumentar a tolerância ao estresse.

Referências

- AEBERSOLD, R. H.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, London, UK, v. 422, n. 6928, p. 198-207, Mar. 2003.
- AEBERSOLD, R. H.; TEPLow, D. B.; HOOD, L. E.; KENT, S. B. H. Electroblotting onto activated glass – high-efficiency preparation of proteins from analytical sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels for direct sequence-analysis. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, MD, v. 261, n. 9, p. 4229-4238, Mar. 1986.
- AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R.; YONEKURA, M.; KUBO, A.; SAJI, H. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Proteomics*, Weinheim, v. 2, p. 947-959, Aug. 2002. Issue 8.

AHSAN, N.; LEE, D. G.; LEE, S. H.; KANG, K. Y.; BAHK, J. D.; CHOI, M. S.; LEE, I. J.; RENAUT, J.; LEE, B. H. A comparative proteomic analysis of tomato leaves in response to waterlogging stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 131, p. 555-570, Dec. 2007(a). Issue 4.

AHSAN, N.; LEE, D. G.; LEE, S. H.; KANG, K. Y.; BAHK, J. D.; CHOI, M. S.; LEE, I. J.; RENAUT, J.; LEE, B. H. A proteomic screen and identification of waterlogging-regulated proteins in tomato roots. **Plant and Soil**, Berlin, v. 295, n. 1-2, p. 37-51, June 2007(b).

AHSAN, N.; LEE, S. H.; LEE, D. G.; LEE, H.; LEE, S. W.; BAHK, J. D.; LEE, B. H. Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 330, p. 735-746, Oct. 2007(c). Issue 10.

AINA, R.; LABRA, M.; FUMAGALLI, P. Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 59, p. 381-392, Apr. 2007. Issue 3.

AKAGAWA, M.; HANDOYO, T.; ISHII, T.; KUMAZAWA, S.; MORITA, N.; SUYAMA, K. Proteomic analysis of wheat flour allergens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 55, p. 6863-6870, Aug. 2007. Issue 17.

ALI, G. M.; KOMATSU, S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. **Journal of Proteome Research**, Columbus, OH, v. 5, n. 2, p. 396-403, Feb. 2006.

AMINI, F.; EHSANPOUR, A. A.; HOANG, Q. T. Protein pattern changes in tomato under in vitro salt stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 54, n. 4, p. 464-471, July 2007.

ANDERSON, N. G.; ANDERSON, N. L. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 17, p. 443-453, 1996. Issue 3.

BALDWIN, M. A. Protein identification by mass spectrometry: issues to be considered. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, MD, v. 3, n. 1, p. 1-9, Jan. 2004.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. Importância das doenças de plantas. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (eds). **Manual de Fitopatologia**. volume 1: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agrônômica Ceres, 1995. 919 p., p. 13-33.

BHUSHAN, D.; PANDEY, A.; CHOUDHARY, M. K.; DATTA, A.; CHAKRABORTY, S.; CHAKRABORTY, N. Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in chickpea extracellular matrix during dehydration stress. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, MD, v. 6, n. 11, p. 1868- 1884, Nov. 2007.

BLACKSTOCK, W. P.; WEIR, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 121-127, Mar. 1999. Issue 3.

BURLINGAME, A. L.; BOYD, R. K.; GASKELL, S. J. Mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Columbus, OH, v. 70, n. 12, p. 647R-716R, June 1998.

CARPENTIER, S. C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K. Banana (*Musa* spp.) as a model to study the meristem proteome: acclimation to osmotic stress. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 92-105, Jan. 2007. Issue 1.

CASH, P. Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 372, p. 121-145, Oct. 1998. Issue 1-2.

CELLINI, F.; CHESSON, A.; COLOUHOUN, I.; CONSTABLE, A.; DAVIES, H. V.; ENGEL, K. H.; GATEHOUSE, A. M. R.; KÄRENLAMPI, S.; KOK, E. J.; LEGUAY J. J.; LEHERSANTA, S.; NOTEBORN, H. P. J. M.; PEDERSEN, J.; SMITH, M. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food and Chemical Toxicology**, New York, NY, v. 42, p. 1089-1125, July 2004. Issue 7.

CHEN, Z. Y.; BROWN, R. L.; DAMANN, K. E.; CLEVELAND, T. E. Identification of maize kernel endosperm proteins associated with resistance to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. **Phytopathology**, St. Paul, ME, v. 97, n. 9, p. 1094-1103, Sept. 2007.

CHEN, C. W.; YANG, Y. W.; LUR, H. S.; TSAI, Y. G.; CHANG, M. C. A novel function of abscisic acid in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) root growth and development. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, UK, v. 47, p. 1-13, Jan. 2006. Issue 1.

- CHIGNARD, N.; BERETTA, L. Proteomics for hepatocellular carcinoma marker discovery. **Gastroenterology**, Bethesda, MD, v.127, p. S120-S125, Nov. 2004. Issue 5, Supplement 1.
- DEVOS, K. M.; GALE, M. D. Genome relationships: The grass model in current research. **Plant Cell**, Waterbury, VT, v. 12, p. 637-646, May 2000. Issue 5.
- DUNHAM, I.; SHIMIZU, N.; ROE, B. A. The DNA sequence of human chromosome 22. **Nature**, London, UK, v. 402, n. 6761, p. 489-495, Dec. 1999.
- EDMAN, P. A method for the determination of the amino acid sequence of peptides. **Archives of biochemistry and biophysics**, Amsterdam, v. 22, p. 475-483, 1949.
- EISENBERG, D.; MARCOTTE, E. M.; XENARIOS, I.; YEATES, T. O. Protein function in the post-genomic era. **Nature**, London, UK, v. 405, n. 6788, p. 823-826, June 2000.
- FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, New York, NY, v. 246, p. 64-71, Oct. 1989. Issue 4926.
- FOSTER, L. J.; HOOG, C. L. de; ZHANG, Y. L.; ZHANG, Y.; XIE, X.; MOOTHA, V.; MANN, M. A mammalian organelle map by protein correlation profiling. **Cell**, Philadelphia, PA, v. 125, n.1, p. 187-199, Apr. 2006.
- FUKUDA, T.; SAITO, A.; WASAKI, J. Metabolic alterations proposed by proteome in rice roots grown under low P and high Al concentration under low pH. **Plant Science**, Amsterdam, v. 172, p. 1157-1165, June 2007. Issue 6.
- GAZANCHIAN, A.; HAJHEIDARI, M.; SIMA, N. K. Proteome response of *Elymus elongatum* to severe water stress and recovery. **Journal of Experimental Botany**, Southampton, UK, v. 58, n. 2, p. 291-300, Jan. 2007.
- GHESQUIERE, B.; VAN DAMME, J.; MARTENS, L.; VANDEKERCKHOVE, J.; GEVAERT, K. Proteome-wide characterization of N-glycosylation events by diagonal chromatography. **Journal of Proteome Research**, Columbus, OH, v. 5, n. 9, p. 2438-2447, Sept. 2006.

GIANAZZA, E.; WAIT, R.; SOZZI, A. Growth and protein profile changes in *Lepidium sativum* L. plantlets exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 59, p. 179-187, Mar. 2007. Issue 2.

GODOY, L. M. F. de; OLSEN, J. V.; SOUZA, G. A. de; LI, G. Q.; MORTENSEN, P.; MANN, M. Status of complete proteome analysis by mass spectrometry: SILAC labeled yeast as a model system. **Genome Biology**, London, UK, v. 7, n. 6, R50, June 2006.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 66, p. 39-63, Mar. 2002. Issue 1.

GUTIERREZ, R. A; SHASHA, D. E.; CORUZZI, G. M. Systems biology for virtual plant. **Plant Physiology**, Rockville, MD, v. 138, p. 550-554, June 2005. Issue 2.

HAJHEIDARI, M.; EIVAZI, A.; BUCHANAN, B. B.; WONG, J. H.; MAJIDI, I.; SALEKDEH, G. H. Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. **Journal of Proteome Research**, Columbus, OH, v. 6, n. 4, p. 1451-1460, Apr. 2007.

HATTRUP, E.; NEILSON, K. A.; BRECI, L.; HAYNES, P. A. Proteomic analysis of shade-avoidance response in tomato leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 55, n. 21, p. 8310-8318, Oct. 2007.

HENZEL, W., BILLECI, T. M., STULTS, J. T., WONG, S. C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 90, n. 11, p. 5011-5015, June 1993.

HERNDL, A.; MARZBAN, G.; KOLARICH, K.; HAHN, R.; BOSCIA, D.; HEMMER, W.; MAGHULY, F.; STOYANOVA, E.; KATINGER, H.; LAIMER, M. Mapping of *Malus domestica* allergens by 2-D electrophoresis and IgE-reactivity. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 28, p. 437-448, Feb. 2007. Issue 3.

IDEKER, T.; GALITSKI, T.; HOOD, L. A new approach to decoding life: systems biology. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, CA, v. 2, p. 343-372, Sept. 2001.

IMIN, N.; KERIM, T.; WEINMAN, J. J.; ROLFE, B. G. Low temperature treatment at the young microspore stage induces protein changes in rice anthers. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, MD, v. 5, n. 2, p. 274-292, Feb. 2006.

INGLE, R. A.; SCHIMIDT, U. G.; FARRANT, J. M. Proteomic analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. **Plant Cell and Environment**, Oxford, UK, v. 30, p. 435-446, Apr. 2007. Issue 4.

JIANG, Y.; YANG, B.; HARRIS, N. S.; DEYHOLOS, M. K. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. **Journal of Experimental Botany**, Southampton, UK, v. 58, n. 13, p. 3591-3607, Oct. 2007.

JORRIN, J. V.; MALDONADO, A. M.; CASTILLEJO, M. A. Plant proteome analysis: a 2006 update. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 2947-2962, Aug. 2007. Issue 16.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10.000 daltons. **Analytical Chemistry**, Columbus, OH, v. 60, n. 20, p. 2299-2301, Oct. 1988.

KARLSSON, A. L.; ALM, R.; EKSTRAND, B.; FJELKNER-MODIG, S.; SCHIÖTT, A.; BENGTSSON, U.; BJÖRK, L.; HJERNO, K.; ROEPSTORFF, P.; EMANUELSSON, C. S. Bet v 1 homologues in strawberry identified as IgE-binding proteins and presumptive allergens. **Allergy**, Oxford, UK, v. 59, p. 1277-1284, Dec. 2004. Issue 12.

KERIM, T.; IMIN, N.; WEINMAN, J. J.; ROLFE, B. G. Proteome analysis of male gametophyte development in rice anthers. **Proteomics**, Weinheim, v. 3, p. 738-751, May 2003. Issue 5.

KEURENTJES, J. J. B.; BENTSINK, L.; ALONSO-BLANCO, C.; HANHART, C. J.; VRIES, H. B. de; EFFGEN, S.; VREUGDENHIL, D.; KOORNNEEF, M. Development of a near-isogenic line population of *Arabidopsis thaliana* and comparison of mapping power with a recombinant inbred line population. **Genetics**, Bethesda, MD, v. 175, p. 891-905, Feb. 2007. Issue 2.

KIM, Y. O.; PAN, S.; JUNG, C. H.; KANG, H. A zinc finger-containing glycine-rich RNA-Binding protein, atrZ-1a, has a negative impact on seed germination and seedling growth of *Arabidopsis thaliana* under salt or drought stress conditions. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, UK, v. 48, n. 8, p. 1170-1181, Aug. 2007.

KITTA, K.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; MORIYANA, T.; OGAWA, T.; KAWAMOTO, S. Detection of low-molecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid-urea polyacrylamide gel. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v. 351, p. 290-297, Apr. 2006. Issue 2.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, Berlin, v. 26, n. 3, p. 231-243, 1975.

LARRAINZAR, E.; WIENKOOP, S.; WECKWERTH, W. *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. **Plant Physiology**, Rockville, MD, v. 144, p. 1495-1507, July 2007. Issue 3.

LAUGESEN, S.; MESSINESE, E.; HEM, S.; PICHEREAUX, C.; GRAT, S.; RANJEVA, R.; ROSSIGNOL, M.; BONNO, J-J. Phosphoproteins analysis in plants: a proteomic approach. **Phytochemistry**, Oxford, UK, v. 67, p. 2208-2214, Oct. 2006. Issue 20.

LEE, D. G.; AHSAN, N.; LEE, S. H.; KANG, K. Y.; BAHK, J. D.; LEE, I. J.; LEE, B .H. A proteomic approach in analyzing heat-responsive proteins in rice leaves. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 3369-3383, Sept. 2007(a). Issue 18.

LEE, D. G.; AHSAN, N.; LEE, S. H.; KANG, K. Y.; BAHK, J. D.; LEE, I. J.; LEE, B. H. An approach to identify cold-induced low-abundant proteins in rice leaf. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 330, p. 215-225, Mar. 2007(b). Issue 3.

LIANG, Y.; CHEN, H.; TANG, M. J.; YANG, P. F.; SHEN, S. H. Responses of *Jatropha curcas* seedlings to cold stress: photosynthesis-related proteins and chlorophyll fluorescence characteristics. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 131, p. 508-517, Nov. 2007. Issue 3.

LIN, S. K.; CHANG, M. C.; TSAI, Y. G.; LUR, H. S. Proteomic analysis of the expression of proteins related to rice quality during caryopsis development and the effect of high temperature on expression. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 2140-2156, May 2005. Issue 8.

LINDSKOG, P. How to cut world hunger in half. **Science**, New York, NY, v. 310, p. 1768-1768, Dec. 2005. Issue 5755.

LUNN, J. E. Compartmentation in plant metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Southampton, UK, v. 58, n. 1, p. 35-47, Jan. 2007.

MACHEREL, D.; BENAMAR, A.; AVELANGE-MACHEREL, M.; TOLLETER, D. Function and stress tolerance of seed mitochondria. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 129, p. 233-241, Jan. 2007. Issue 1.

MAJOU, T.; BANCEL, E.; TRIBOI, E.; BEN HAMIDA, J.; BRANLARD, G. Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat-responsive proteins from non-prolamins fraction. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, p. 505-513, Feb. 2004. Issue 2.

MALAKSHAH, S. N.; REZAEI, M. H.; HEIDARI, M.; SALEKDEH, G. H. Proteomic reveals new salt responsive proteins associated with rice plasma membrane. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 71, n. 9, p. 2144-2154, 2007.

MANN, M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. **Nature Review Molecular Cell Biology**, London, UK, v. 7, n. 12, p. 952-958, Dec. 2006.

MAOR, R.; JONES, A.; NÜHSE, T. S.; STUDHOLME, D. J.; PECK, S. C.; SHIRASU, K. Multidimensional protein identification technology (MudPIT) analysis of ubiquitinated proteins in plants. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, MD, v. 6, n. 4, p. 601-610, Apr. 2007.

MARTINOIA, E.; MAESHIMA, M.; NEUHAUS, H. E. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Southampton, UK, v. 58, n. 1, p. 83-102, Jan. 2007.

MCDONALD, T.; SHENG, S.; STANLEY, B.; CHENG, D.; KO, Y.; COLE, R. N.; PEDERSEN, P.; VAN EYK, J. E. Expanding the subproteome of the inner mitochondria using protein preparation technologies. One- and two-dimensional liquid chromatography and two-dimensional gel electrophoresis. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, MD, v. 5, n. 12, p. 2392-2411, Dec. 2006.

MICHE, L.; BATTISTONI, F.; GERNMER, S.; BELGHAZI, M.; REINHOLD-HUREK, B. Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. **Molecular Plant Microbe Interaction**, St. Paul, MN, v. 19, n. 5, p. 502-511, May 2006.

O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal Of Biological Chemistry**, Bethesda, MD, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, May 1975.

OLSEN, J.; BLAGOEV, B.; GNAD, F.; MACEK, B.; KUMAR, C.; MORTENSEN, P.; MANN, M. Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. **Cell**, Philadelphia, PA, v. 127, n. 3, p. 635-648, Nov. 2006.

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

PATTERSON, J.; FORD, K.; CASSIN, A. Increased abundance of proteins involved in phytosiderophore production in boron-tolerant barley. **Plant Physiology**, Rockville, MD, v. 144, p. 1612-1631, July 2007. Issue 3.

PETERSEN, A.; DRESSELHAUS, T.; GROBE, K.; BECKER, W. M. Proteome analysis of maize pollen for allergy-relevant components. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, p. 6317-6325, Dec. 2006. Issue 23.

PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G.; SUJII, E. R.; FERNANDES, H. M. C.; GOMES, D. F. Ocorrência de *Anagrus* sp. (Hymenoptera, Mymaridae) parasitando ovos de *Deois flavopicta* Stal. (Homoptera, Cercopidae) em pastagens do Brasil Central. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 411-413, Set. 1993.

PORUBLEVA, L.; VELDEN, K.; KOTHARI, S.; OLIVER, D.; CHITNIS, P. The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 22, p. 1724-1738, May 2001. Issue 9.

RADHAMONY, R. N.; THEG, S. M. Evidence for an ER to Golgi to chloroplast protein transport pathway. **Trends in Cell Biology**, London, UK, v. 16, p. 385-387, Aug. 2006. Issue 8.

REINDERS, J.; SICKMANN, A. State-of-the-art in phosphoproteomics. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 4052-4061, Nov. 2005. Issue 16.

RENAUT, J.; LUTTS, S.; HOFFMANN, L.; HAUSMAN, J. F. Responses of poplar to chilling temperatures: proteomic and physiological aspects. **Plant Biology**, Oxford, UK, v. 6, p. 81-90, Jan. 2004. Issue 1.

ROSSIGNOL, M. Proteomic analysis of phosphorylated proteins. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 9, p. 538-543, Oct. 2006. Issue 5.

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

RUEBELT, M. C.; LEIMGRUBER, N. K.; LIPP, M.; REYNOLDS, T.; NEMETH, M. A.; ASTWOOD, J. D.; ENGEL, K-H.; JANY, K-D. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 1. Assessing analytical validation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 54, n. 6, p. 2154-2161, Mar. 2006(a).

RUEBELT, M. C.; LIPP, M.; REYNOLDS, T.; ASTWOOD, J. D.; ENGEL, K-H.; JANY, K-D. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 2. Assessing natural variability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 54, n. 6, p. 2162-2168, Mar. 2006(b).

RUEBELT, M. C.; LIPP, M.; REYNOLDS, T.; SCHMUKE, J. J.; ASTWOOD, J. D.; DELLA PENNA, D.; ENGEL, K-H.; JANY, K-D. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 3. Assessing unintended effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 54, n. 6, p. 2169-2177, Mar. 2006(c).

SALEKDEH, G. H.; KOMATSU, S. Crop proteomics: aim at sustainable agriculture of tomorrow. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 2976-2996, Aug. 2007. Issue 16.

SCHEELE, G. A. Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, MD, v. 250, n. 14, p. 5375-5385, July 1975.

SHEVCHENKO, A.; JENSEN, O.; PODTELEJNIKOV, A.; SAGLIOCCO, F.; WILM, M.; VORM, O.; MORTENSEN, P.; SHEVCHENKO, A.; BOUCHERIE, H.; MANN, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two-dimensional gels. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 93, n. 25, p. 14440-14445, Dec. 1996.

SHARMA, N.; RAHMAN, M. H.; STRELKOV, S.; THIAGARAJAH, M.; BANSAL, V. K.; KAV, N. N. V. Proteome-level changes in two *Brassica napus* lines exhibiting differential responses to the fungal pathogen *Alternaria brassicæ*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 172, p. 95-110, Jan. 2007. Issue 1.

SLATE, J. Quantitative trait locus mapping in natural populations: progress, caveats and future directions. **Molecular Ecology**, Vancouver, BC, v. 14, p. 363-379, Feb. 2005. Issue 2.

STEEN, H., MANN, M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. **Nature Reviews-Molecular Cell Biology**, London, UK, v. 5, n. 9, p. 699-711, Sept. 2004.

TETLOW, I. J.; WAIT, R.; LU, Z.; AKKASAENG, R. Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. **Plant Cell**, Rockville, MD, v. 16, p. 694-708, Mar. 2004. Issue 3.

TORRES, N. L.; CHO, K.; SHIBATO, J.; HIRANO, M.; KUBO, A.; MASUO, Y.; IWASHI, H.; JWA, N. S.; AGARWAL, G. K.; RAKWAL, R. Gel-based proteomics reveals potential novel protein markers of ozone stress in leaves of cultivated bean and maize species of Panama. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 28, p. 4369-4381, Dec. 2007. Issue 23.

VALÉRIO, J. R. Constatação da bainha salivar e pontos de sucção resultantes da alimentação de *Zulia entreriana* (Berg, 1879) (Homoptera: Cercopidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, ano 18, p. 169-174, 1989. Suplemento.

VALÉRIO, J. R.; NAKANO, O. Sintomatologia dos danos causados pelo adulto da cigarrinha *Zulia entreriana* (Berg, 1879) (Homoptera: Cercopidae) em *Brachiaria decumbens* STAPF. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, ano 21, n. 1, p. 95-100, 1992.

VENTELON-DEBOUT, M.; DELALANDE, F.; BRIZARD, J. P.; DIEMER, H.; DORSSELAER, A. V.; BRUGIDOU, C. Proteome analysis of cultivar-specific deregulations of *Oryza sativa indica* and *O. sativa japonica* cellular suspensions undergoing *Rice yellow mottle virus* infection. **Proteomics**, Weinheim, v. 4, p. 216-225, Jan. 2004. Issue 1.

VINCENT, D.; ERGUL, A.; BOHLMAN, M. C.; TATTERSALL, E. A. R.; TILLETT, R. L.; WHEATLEY, M. D.; WOOLSEY, R.; QUILICI, D. R.; JOETS, J.; SCHLAUCH, K.; SCHOOLEY, D. A.; CUSHMAN, J. C.; CRAMER, G. R. Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. **Journal of Experimental Botany**, Southampton, v. 58, n. 7, p. 1873-1892, May 2007.

YAN, S. P.; ZHANG, Q. Y.; TANG, Z. C.; SU, W. A.; SUN, W. N. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, MD, v. 5, n. 3, p. 484-496, Mar. 2006.

YANG, P. F.; CHEN, H.; LIANG, Y. Proteomic analysis of de-etiolated rice seedlings upon exposure to light. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 2459-2468, July 2007(a). Issue 14.

YANG, Q. S.; WANG, Y. Q.; ZHANG, J. J. Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach. Cysteine synthase as a key player in Al response. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, p. 737-749, Mar. 2007(b). Issue 5.

YILDIZ, M. Two-dimensional electrophoretic analysis of soluble leaf proteins of a salt-sensitive (*Triticum aestivum*) and a salt-tolerant (*T. durum*) cultivar in response to NaCl stress. **Journal of Integrative Plant Biology**, Oxford, UK, v. 49, p. 975-981, July 2007. Issue 7.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology And Genetic Engineering Reviews**, Newcastle, v. 13, p. 19-50, 1995.

WILM, M.; MANN, M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. **Analytical Chemistry**, Columbus, OH, v. 68, n. 1, p. 1-8, Jan. 1996.

WULFKUHLE, J.; ESPINA, V.; LIOTTA, L.; PETRICIONI, E. Genomic and proteomic technologies for individualization and improvement of cancer treatment. **European Journal of Cancer**, v. 40, p. 2623-2632, Nov. 2004. Issue 17.

ZANG, X.; KOMATSU, S. A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. **Phytochemistry**, Oxford, UK, v. 68, p. 426-437, Feb. 2007. Issue 4.

ZHOU, W.; EUDES, F.; LAROCHE, A. Identification of differentially regulated proteins in response to a compatible interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host *Triticum aestivum*. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, p. 4599-4609, Aug. 2006. Issue 16.

ZHU, J. M.; ALVAREZ, S.; MARSH, E. L.; LE NOBLE, M. E.; CHO, I. J.; SIVAGURU, M.; CHEN, S. X.; NGUYEN, H. T.; WU, Y. J.; SCHACHTMAN, D. P.; SHARP, R. E. Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. II. Region-specific changes in water soluble and lightly ionically bound proteins under water deficit. *Plant Physiology*, Rockville, MD, v. 145, p. 1533-1548, Dec. 2007. Issue 4.



Gado de Corte

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Governo
Federal**

CGPE 7731