



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**AVALIAÇÃO DA MITIGAÇÃO DA TOXICIDADE DE CÁDMIO POR  
MANGANÊS EM PLANTAS JOVENS DE CACAU PELA ANÁLISE  
PROTEÔMICA DE FOLHAS E RAIZES**

**BRUNA RAFAELA MACHADO OLIVEIRA**

**Ilhéus – Bahia – Brasil  
Fevereiro – 2019**

BRUNA RAFAELA MACHADO OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA MITIGAÇÃO DA TOXICIDADE DE CÁDMIO POR  
MANGANÊS EM PLANTAS JOVENS DE CACAU PELA ANÁLISE  
PROTEÔMICA DE FOLHAS E RAIZES**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de  
Santa Cruz, como parte das  
exigências para a obtenção do  
título de Mestre em Genética e  
Biologia Molecular.

**Área de concentração:**  
Genética e Biologia Molecular

**Ilhéus – Bahia – Brasil  
Fevereiro – 2019**

O48

Oliveira, Bruna Rafaela Machado.

Avaliação da mitigação da toxicidade de Cádmi-  
o por Manganês em plantas jovens de cacau pela aná-  
lise proteômica de folhas e raízes / Bruna Rafaela  
Machado Oliveira. – Ilhéus, BA: UESC, 2019.  
99f. : il.

Orientador: Pedro Antônio Oliveira Mangabeira  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual  
de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Biologia Molecular.  
Inclui referências.

1. Metais – Toxicologia. 2. Proteômica –  
Análise.  
3. Cacaueiro. I. Título.

CDD 571.9543

BRUNA RAFAELA MACHADO OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA MITIGAÇÃO DA TOXICIDADE DE CÁDMIO POR  
MANGANÊS EM PLANTAS JOVENS DE CACAU PELA ANÁLISE  
PROTEÔMICA DE FOLHAS E RAIZES**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de  
Santa Cruz, como parte das  
exigências para a obtenção do  
título de Mestre em Genética e  
Biologia Molecular.

**Área de concentração:**  
Genética e Biologia Molecular

APROVADA:

---

Dra. Bruna Carmo Rehem  
IFBA

---

Dr. Pedro Antônio Oliveira Mangabeira  
UESC

---

Dr. Marcio Gilberto Cardoso Costa  
UESC

---

Dra. Milena do Amaral Santos  
UESC

**Ilhéus – Bahia – Brasil  
Fevereiro – 2019**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada é possível. A caminhada foi longa e sem Ele não conseguiria chegar até aqui.

À minha família, em especial mãe, pai, avós e irmãos, pelo apoio incondicional, suporte e incentivo em todas as etapas da vida. Sem vocês nada disso teria acontecido.

Ao Raphael, meu noivo, pela paciência, compreensão, companheirismo e incentivo durante todo esse período que amenizou as dificuldades encontradas e me deu força.

Aos amigos, em especial ao grupo “Luciano tem um grupo”, pelo companheirismo, força, palavras de ânimo e descontração quando as coisas não iam bem, vocês tornaram esses momentos mais felizes e fáceis.

Ao meu orientador Dr. Pedro Antonio Oliveira Mangabeira e co-orientadores Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida e Dr. Carlos Priminho Pirovani, pela confiança e orientação, e pelos exemplos de dedicação à pesquisa, de competência, integridade e lealdade. Obrigada, professor Alex-Alan, pelos conselhos e ajuda.

À minha turma de mestrado em especial à Carine, Nayara, Malu, Alda, Ariana, Fernanda e Ívina pelo companheirismo, amizade, ajuda incondicional, pelo amparo e carinho. Vocês tornaram a jornada mais divertida. Levarei vocês sempre comigo.

Ao grupo da Fisiologia Vegetal, por toda ajuda e companheirismo durante essa caminhada, principalmente à Dávila, por todo o ensinamento e ajuda, sem você seria muito difícil.

Ao grupo proteômicos, por toda ajuda, apoio e disponibilidade.

Ao técnico de laboratório Horlei, pela ajuda que não foram poucas, pelos conselhos, sorrisos, boa vontade e amizade.

Ao Edinho, por toda ajuda na parte de Bioinformática, não tenho nem palavras para agradecer.

A secretaria e ao programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, por toda ajuda e paciência.

Aos professores e funcionários do Centro de Biotecnologia e Genética (CBG), em especial a Jô.

A FAPESB, pela concessão da bolsa ao longo da pós-graduação.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o êxito deste trabalho, meu eterno agradecimento.

OLIVEIRA, Bruna Rafaela Machado. Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, fevereiro de 2019. **Avaliação da mitigação da toxicidade de cádmio por manganês em plantas jovens de cacau pela análise proteômica de folhas e raízes.** Orientador: Dr. Pedro Antonio Oliveira Mangabeira. Coorientadores: Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida e Dr. Carlos Priminho Pirovani.

## RESUMO

O cádmio (Cd) é um metal não essencial e altamente tóxico para plantas, animais e seres humanos, mesmo em concentrações muito baixa. Este elemento metálico pode se acumular em diversas partes da planta, causando distúrbios fisiológicos, bioquímicos e moleculares. Recentemente, tem-se encontrado Cd em amêndoas de cacau e nos produtos derivados, a exemplo do chocolate. O manganês (Mn) desempenha um papel importante na maquinaria fotossintética que envolve o oxigênio e pode interagir com Cd e atenuar os seus efeitos tóxicos em plantas. O decréscimo da concentração de Cd em plantas, após a adição de Mn, e vice-versa, pode ser explicado pela competição para os mesmos transportadores de membrana. Portanto, faz-se necessário estudos para elucidar o processo de mitigação da toxicidade de Cd por Mn, em genótipos de cacau, de modo a reduzir os riscos à saúde do ser humano devido ao acúmulo de Cd nas amêndoas e consequente contaminação do chocolate por esse metal. Objetivou-se avaliar nesse trabalho os mecanismos de resposta do Mn na mitigação dos efeitos tóxicos de Cd em plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, submetidas a 1,6 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo, 0,8 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo e à combinação de 0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo, juntamente com o tratamento controle (sem adição de Cd e Mn no solo), por meio de análise das mudanças no perfil de proteínas exclusivas (PE) e proteínas diferencialmente acumuladas (PDA). Fez-se extração e quantificação de proteínas foliares e radiculares dos diversos tratamentos, seguida de análise proteômica. Em amostras foliares, cerca de 8 PDA foram identificadas e 38 PE, ao passo que em raízes foram identificadas 43 PDA e 21 PE. Destas proteínas, foram identificadas algumas proteínas importantes, que foram induzidas na presença de Cd e reprimidas na presença de Mn+Cd, ou vice-versa, mostrando uma mitigação da toxicidade de Cd por Mn, como é o caso das ATPases, redutase da isoflavona, proteassoma e chaperonina. A toxicidade de Cd afetou proteínas de resposta à defesa e estresse nas folhas e dos processos metabólicos nas raízes enquanto que a combinação de Mn+Cd houve maior acúmulo de proteínas envolvidas em processos metabólicos em folhas e resposta a defesa e estresse em raízes. Além disso, a maioria das PDA e PE das amostras foliares estão relacionadas a processos fotossintéticos (35%) e das amostras radiculares a maioria estão relacionadas a outras funções (30%). Por meio da imunodeteção também foi possível constatar a mitigação da toxicidade de Cd por Mn, visto que, houve maior acúmulo da catalase no tratamento com Cd (sendo este 2x maior) e menor acúmulo com o Mn+Cd. Conclui-se, portanto, que proteínas envolvidas em processos de oxidorredução e resposta à defesa e estresse, além de outros processos, foram induzidas na presença de Cd e reprimida na presença de Mn+Cd, mostrando que o Mn conseguiu mitigar os efeitos tóxicos de Cd em plantas jovens de cacau.

**Palavras-chave:** metal tóxico, perfil proteômico, *Theobroma cacao*.



OLIVEIRA, Bruna Rafaela Machado. Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, February, 2019. **Evaluation of the mitigation of cadmium toxicity by manganese in young cocoa plants by the proteomic analysis of leaves and roots.** Advisor: Dr. Pedro Antonio Oliveira Mangabeira. Co-advisor: Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida e Dr. Carlos Priminho Pirovani.

## ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a non-essential and highly toxic metal for plants, animals and humans, even at very low concentrations. This metal element can accumulate in various parts of the plant, causing physiological, biochemical and molecular disturbances. Recently, Cd has been found in cocoa almonds and in the by-products, as in the case of chocolate. Manganese (Mn) plays an important role in photosynthetic machinery that involves oxygen and can interact with Cd and attenuate its toxic effects on plants. The decrease in Cd concentration in plants after the addition of Mn and vice versa can be explained by competition for the same membrane carriers. Therefore, studies are needed to elucidate the process of mitigating the toxicity of Cd by Mn in cocoa genotypes in order to reduce human health risks due to the accumulation of Cd in almonds and consequent contamination of chocolate by this metal. The objective of this work was to evaluate the mechanisms of action of Mn in the mitigation of the toxic effects of Cd in young plants of the CCN 51 cacao genotype submitted to 1.6 mmol Mn kg<sup>-1</sup> soil, 0.8 mmol Cd kg<sup>-1</sup> soil and to the combination of 0.4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> soil + 0.8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> soil, together with the control treatment (without addition of Cd and Mn in the soil), by means of analysis of the changes in the protein profile (PE) and differentially accumulated proteins (PDA). Leaf and root proteins were extracted and quantified from the different treatments, followed by proteomic analysis. In leaf samples, about 8 PDA were identified and 38 PE, whereas in roots were identified 43 PDA and 21 PE. Of these proteins, some important proteins were identified, which were induced in the presence of Cd and repressed in the presence of Mn + Cd, or vice versa, showing a mitigation of Cd for Mn toxicity, as is the case of ATPases, isoflavone reductase, proteasome and chaperonin. Cd toxicity affected protein response to leaf defense and stress and metabolic processes in roots, while the combination of Mn+Cd showed higher accumulation of proteins involved in leaf metabolism and defense response and root stress. In addition, most of the PDA and PE of the leaf samples are related to photosynthetic processes (35%) and the majority radicular samples are related to other functions (30%). By means of immunodetection it was also possible to verify the mitigation of Cd for Mn toxicity, since there was a greater accumulation of catalase in the treatment with Cd (being 2x greater) and less accumulation with Mn+Cd. It was concluded, therefore, that proteins involved in oxidoreduction and defense and stress response processes, in addition to other processes, were induced in the presence of Cd and repressed in the presence of Mn+Cd, showing that Mn was able to mitigate the toxic effects of Cd in young cacao plants.

**Key-words:** toxic metal, proteomic profile, *Theobroma cacao*.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Perfil proteico das amostras foliares e radiculares em 1D-SDS-PAGE de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos de Cd, Mn e Cd+Mn no solo. **M** – marcador molecular; **C** – controle: sem adição de Mn e Cd no solo; **Mn** – (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo); **Cd** – (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e **Cd+Mn** – (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo). kDa corresponde à massa molecular.....41

**Figura 2** – Perfil proteico das amostras foliares em 2D-PAGE de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos de Cd, Mn e Cd+Mn no solo. **A** - C (controle: sem adição de Mn e Cd no solo); **B** - Mn (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo); **C** - Cd (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e **D** – Cd+Mn (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo), com marcação dos *spots*. *Spots* vermelhos: diferencialmente acumulados, *spots* pretos: exclusivos. kDa corresponde à massa molecular e pl o ponto isoelétrico de cada *spot*, variando de 3-10 NL (não linear).....42

**Figura 3** – Perfil proteico das amostras radiculares em 2D-PAGE de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos de Cd, Mn e Cd+Mn no solo. **A** - C (controle: sem adição de Mn e Cd no solo); **B** - Mn (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo); **C** - Cd (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e **D** – Cd+Mn (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo), com marcação dos *spots*. *Spots* vermelhos: diferencialmente acumulados, *spots* pretos: exclusivos. kDa corresponde à massa molecular e pl o ponto isoelétrico de cada *spot*, variando de 3-10 NL (não linear).....43

**Figura 4** – Diagrama de Venn, mostrando a distribuição dos *spots* de amostras foliares detectados em 2D-PAGE de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos controle (sem adição de Mn e Cd no solo), Cd (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo), Mn (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e Cd+Mn (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo) no solo.....44

**Figura 5** – Diagrama de Venn, mostrando a distribuição dos *spots* de amostras radiculares detectados em 2D-PAGE de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos controle (sem adição de Mn e Cd no solo), Cd (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo), Mn (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e Cd+Mn (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo) no solo.....45

**Figura 6** – Distribuição dos *spots* proteicos de amostras foliares e radiculares detectados em gel 2D-PAGE, de acordo com a massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pl), de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos C (controle: sem adição de Mn e Cd no solo), Cd (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo), Mn (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e Cd+Mn no solo (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo). **A** – Massa molecular das amostras foliares; **B** – Massa molecular das amostras radiculares; **C** – Ponto isoelétrico das amostras foliares e **D** – Ponto isoelétrico das amostras radiculares.....46

**Figura 7** – Categorização funcional de proteínas diferencialmente acumuladas e exclusivas de amostras foliares de plantas jovens de cacau submetidas aos

tratamentos controle (sem adição de Mn e Cd no solo), Cd (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo), Mn (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e Cd+Mn (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo) no solo.....61

**Figura 8** – Categorização funcional de proteínas diferencialmente acumuladas e exclusivas de amostras radiculares de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos controle (sem adição de Mn e Cd no solo), Cd (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo), Mn (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e Cd+Mn (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo) no solo.....61

**Figura 9** – *Heat map* de expressão de proteínas identificadas de amostras foliares baseada no perfil de acumulação.....62

**Figura 10** – *Heat map* de expressão de proteínas identificadas de amostras radiculares baseada no perfil de acumulação.....63

**Figura 11** – Rede de interação das proteínas identificadas das amostras foliares e radiculares de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos de Cd, Mn e Cd+Mn no solo. **A** – Rede de interação das amostras foliares; **B** – rede de interação das amostras radiculares; **C** – rede de interação das amostras foliares separadas por *clusters*; **D** – rede de interação das amostras radiculares separadas por *clusters*. As interações foram geradas e visualizadas no *software STRING* 10.5 com nível de confiança 0.70 e reconstruídas pelo *software Cytoscape*.....66

**Figura 12** – *Western blot* utilizando o anticorpo contra catalase e Subunidade  $\beta$ -ATP sintase das amostras foliares e radiculares de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos de Cd, Mn e Cd+Mn no solo. **A** - C (controle: sem adição de Mn e Cd no solo); Mn (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo); Cd (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e Cd+Mn (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo). kDa corresponde à massa molecular; **B** – Gel espelho; **C** – Acúmulo desta proteína nas amostras foliares; **D** – Acúmulo desta proteína nas amostras radiculares estimado por meio do programa Gel Quant Net 8.0.....69

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Proteínas identificadas de amostras foliares de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos controle (sem adição de Mn e Cd no solo), Cd (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo), Mn (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e Cd+Mn (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo) no solo, por meio de espectrometria de massas (MS/MS).....49

**Tabela 2** – Proteínas identificadas de amostras radiculares de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos controle (sem adição de Mn e Cd no solo), Cd (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo), Mn (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e Cd+Mn (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo) no solo, por meio de espectrometria de massas (MS/MS).....54

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Metais tóxicos.....	18
2.2 Cádmio.....	19
2.3 Manganês.....	21
2.4 Toxicidade de Cd em plantas.....	22
2.5 Mecanismos de respostas das plantas ao estresse por Cd.....	25
2.6 Mitigação da toxicidade de Cd.....	27
2.7 Estudo proteômico de respostas ao estresse por Cd.....	28
2.8 <i>Theobroma cacao</i> e a presença de Cd no cacau.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	33
3.2 Análise proteômica.....	33
3.2.1 Extração de proteínas totais de amostras foliares e radiculares.....	33
3.2.2 Quantificação de proteínas totais e eletroforese em gel SDS-PAGE.....	35
3.2.3 Focalização isoeletrica.....	35
3.2.4 SDS-PAGE Bi-dimensional.....	36
3.2.5 Análise de géis pelo <i>Software Image Master</i> .....	37
3.2.6 Preparação de <i>spots</i> para espectrometria de massas.....	38
3.2.7 Espectrometria de massas (MS).....	38
3.3 <i>Western blot</i> .....	39
3.4 Rede de interação.....	40
3.5 Análises estatísticas.....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Perfil proteico de amostras foliares e radiculares, obtido por meio de eletroforese SDS-PAGE e bidimensional (2D-PAGE).....	42

4.2 Avaliação da distribuição de <i>spots</i> no gel 2-D quanto à massa molecular (MM) e o ponto isoelétrico (pI).....	46
4.3 Identificação de proteínas.....	48
4.4 Classificação funcional de proteínas foliares e radiculares .....	65
4.5 Rede de interação proteica.....	66
4.6 <i>Western Blot</i> .....	69
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÕES.....	81

## 1. INTRODUÇÃO

O cádmio (Cd), um metal tóxico não essencial, é provavelmente, o poluente mais significativo devido à sua alta toxicidade para muitas espécies vegetais, mesmo em uma concentração muito baixa (PINTO et al., 2004). Devido à alta solubilidade em água, é facilmente absorvido e acumulado pelas plantas, afetando fortemente o seu crescimento e a sua produtividade (BENAVIDES et al., 2005; DALCORSO et al., 2008). A maioria das pesquisas sobre poluição por Cd está focada nos processos envolvidos no acúmulo de Cd em plantas cultivadas e sobre as consequências desse acúmulo sobre a saúde humana (WAGNER, 1993). As plantas superiores são capazes de absorver Cd, em função da sua disponibilidade e da concentração, a partir do solo ou da água; muito pouco é absorvido diretamente da atmosfera (CLEMENS, 2006). A fitotoxicidade por Cd, no entanto, é um problema relevante, especialmente em algumas regiões altamente poluídas por metais, onde foi observada uma diminuição na produtividade das culturas agrícolas (VASSILEV; YORDANOV, 1997).

O cádmio, sendo altamente móvel no floema, pode se acumular em determinadas partes da planta e promover distúrbios como (i) alterações morfológicas e ultraestruturais em folhas e raízes (SOUZA et al., 2011), (ii) clorose (CHAFFEI et al., 2004) e epinastia foliar (ZHAO et al., 2006), (iii) lignificação da parede celular nas raízes e folhas, (iv) redução na fotossíntese líquida, condutância estomática e transpiração foliar (SOUZA et al., 2011), (v) peroxidação lipídica (IANNONE et al., 2010), (vi) alteração na absorção de nutrientes, (vii) alterações morfológicas típicas de apoptose em núcleos de pontas de raízes e células foliares, (viii) indução de morte celular programada (SOUZA et al., 2011), (ix) perturbação no metabolismo de N e de S e na maquinaria antioxidante da planta (GILL; TUTEJA, 2011), (x) mudanças no balanço hídrico e inibição do crescimento devido à redução na concentração de clorofila e inibição da síntese de clorofila, na abertura dos estômatos e escurecimento das raízes (RODRÍGUEZ-SERRANO et al., 2009) e (xi) alterações no metabolismo germinativo das sementes (SMIRI et al., 2010).

O manganês é um nutriente essencial para todas as culturas, sendo um elemento tóxico quando em excesso. A toxidez de Mn é favorecida em solos ácidos (PENDIAS; PENDIAS, 1992). Nas plantas, Mn tem um papel fundamental na fotossíntese por meio de sua participação no sistema de oxidação da molécula de água em nível de fotossistema 2 (PS2), que fornece os elétrons necessários para a fotossíntese (WHITE; GREENWOOD, 2013), o qual foi recentemente mostrado ser útil no diagnóstico de deficiência de Mn, por meio de efeitos sobre a fluorescência da clorofila (SCHMIDT et al., 2013). No entanto, seu excesso também pode ser prejudicial para o aparato fotossintético (MUKHOPADHYAY; SHARMA, 1991). Assim, Mn tem dois estados nos processos metabólicos das plantas: (i) como um micronutriente essencial e (ii) como elemento tóxico quando em excesso (DUCIC; POLLE, 2005).

Demonstrou-se que Mn pode interagir com Cd no ambiente, sendo Mn capaz de atenuar os efeitos tóxicos de Cd em plantas (ZORNOZA et al., 2010). Mas os mecanismos envolvidos nessa atenuação ainda não estão bem elucidados. A atenuação da toxicidade de Cd por adição de Mn em *Phytolacca americana* foi acompanhada pela redução significativa das concentrações de Cd em todos os órgãos da planta (PENG et al., 2008). Também foi encontrado em *Glycine max* que a absorção de Cd pelas raízes das plantas foi reduzida por Mn (CATALDO et al., 1983). Por outro lado, uma redução na absorção de Mn também foi observada em plantas estressadas pelo Cd (ZHANG et al., 2003). Além disso, o antagonismo entre Cd e Mn tem sido observado em plantas estressadas por Cd. Relatos mostram reduções na absorção de Mn e acúmulo na parte aérea e raízes, em diferentes plantas de *Hordeum vulgare*, quando cultivadas em meio poluído por Cd (WU et al., 2003).

Esta interação também pode ser utilizada no cacau (*Theobroma cacao*) que é uma espécie lenhosa típica de clima tropical, diploide ( $2n = 20$ ), preferencialmente alógama, perene e, dentre as 22 espécies que compõem o gênero, apenas o cacau e o cupuaçu são explorados comercialmente no Brasil (ALMEIDA; VALLE, 2007). Em condições de cultivo, geralmente chega a 5 m de altura, podendo atingir até 20 m, quando em condições silvestres (BARTLEY, 2005). Por outro lado, é considerado uma das espécies perenes mais importantes do planeta, com uma produção mundial de amêndoas



estimada em 4,5 milhões de toneladas na safra 2016-2017, segundo a Organização Internacional do cacau (ICCO).

O cultivo do cacau é explorado principalmente para a produção de manteiga e chocolate, obtidos de sementes fermentadas (amêndoas) de seus frutos, embora suas amêndoas possam ser utilizadas também para a produção de cosméticos, bebidas, geléias, cremes e sucos (ALMEIDA; VALLE, 2007). Além disso, suas amêndoas são fontes de carboidratos, proteínas, minerais, flavonoides e vitaminas, que são as matérias-primas em uma economia industrial competitiva e multibilionária (ALMEIDA; VALLE, 2007).

Há plantações comerciais de cacau em diversas partes do mundo (DANTAS; GUERRA, 2010), sendo as Américas responsáveis por quase 13% da produção global de cacau e o Brasil incluso entre os principais países produtores no ranque mundial. Os estados brasileiros produtores de cacau são Rondônia, Amazonas, Roraima, Pará, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Mato Grosso, sendo a Bahia e o Pará os maiores produtores e representantes de cerca de 95% da produção nacional (CONAB, 2017).

Atualmente, existe uma preocupação internacional em relação à presença de metais tóxicos em amêndoas de cacau. Estudos recentes mostraram que As, Bi, Cr, Cd e Pb podem ser acumulados em amêndoas de cacau, tanto nos cotilédones como no tegumento (película que reveste a amêndoa), principalmente no tegumento, e produtos à base de cacau (HUAMANI et al., 2012; CHAVEZ et al., 2015; BERTOLDI et al., 2016). Isto, por sua vez, acarreta riscos potenciais à saúde humana pela ingestão de produtos contaminados. Em relação ao Cd em cacau, foi relatado que as amêndoas contêm diferentes concentrações de Cd, dependendo não apenas do genótipo, mas também do local geográfico, cujas concentrações médias atingem 1,4 mg Cd kg<sup>-1</sup> MS na América do Sul, 0,5 mg Cd kg<sup>-1</sup> MS na África Oriental e na América Central, 0,3 mg Cd kg<sup>-1</sup> MS na Ásia e 0,09 mg Cd kg<sup>-1</sup> MS na África Ocidental (BERTOLDI et al., 2016).

Em solos agrícolas, as principais vias de contaminação por metais tóxicos são representadas pela rocha que deu origem a formação do solo, sendo as rochas vulcânicas as que contêm maior concentração de metais, pelos resíduos industriais, aplicação de lodo de esgoto, fungicidas, inseticidas e fertilizantes químicos, principalmente os fosfatados. A possibilidade de

detecção de alguns metais tóxicos, como Cd, em resíduos de cacau não pode ser evitada, devido ao fato de que a maioria dos solos agricultáveis apresentam estes elementos metálicos.

O cádmio é facilmente absorvido pelas raízes e translocados para a parte aérea das plantas, podendo ser armazenado nos componentes do fruto de cacau. Contudo, Mn pode atuar no metabolismo da planta reduzindo e, ou eliminando o efeito tóxico do Cd, uma vez que Mn é absorvido em grandes quantidades pelo cacau sem, geralmente, lhe causar toxidez. Portanto, faz-se necessário estudos para elucidar o processo de mitigação da toxicidade de Cd por Mn em genótipos de cacau, de modo a reduzir os riscos à saúde do ser humano, devido ao acúmulo de Cd em suas amêndoas e consequente contaminação dos produtos derivados, a exemplo do chocolate.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar os mecanismos de ação de Mn na mitigação do efeito tóxico de Cd em plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51, por meio de análise das mudanças no perfil de proteínas exclusivas e diferencialmente acumuladas em folhas e raízes e da detecção, via *Western Blot*, de proteínas específicas de resposta ao estresse nestes órgãos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Metais tóxicos**

Os metais tóxicos são convencionalmente definidos como elementos com propriedades metálicas (ductilidade, condutividade, estabilidade de cátions, a especificidade do ligante, dentre outras) que possuem número atômico maior que 20 e densidade maior que  $5 \text{ g cm}^{-3}$ . Dentre os 90 elementos naturais, 53 são metais tóxicos (BENAVIDES et al., 2005) e nesse grupo incluem-se os micronutrientes Cu, Fe, Mn, Ni e Zn. Estes últimos são considerados essenciais para sistemas biológicos em baixas concentrações, estando envolvidos em reações de oxidorredução e atuam como cofatores enzimáticos (SANITÁ DI TOPPI; GABBRIELLI, 1999), mas podem ser tóxicos em altas concentrações.

Os elementos metálicos ocorrem naturalmente na crosta terrestre ou podem ser liberados para o meio ambiente pelos seres humanos, por meio de atividades industriais e de mineração e uso de fertilizantes e pesticidas. Estas e outras atividades promovem um aumento na concentração desses elementos na biosfera, que, ao contrário da maioria dos poluentes, não são biodegradáveis e persistem no meio ambiente (PRASAD; FREITAS, 2003; PILON-SMITS, 2005; BENAVIDES et al., 2005). Além disso, estes metais são considerados o principal grupo de poluentes inorgânicos e causam sérios problemas para a vida dos seres vivos, quando presentes na atmosfera, no solo e na água (SANITÁ DI TOPPI; GABBRIELLI, 1999; YANG et al., 2005).

No meio ambiente, tendem a se concentrar em solos e sedimentos de sistemas aquáticos, tornando-o potencialmente disponível para sistemas radiculares e para animais (PRASAD, 1995). Assim, a biodisponibilidade dos metais tóxicos depende de sua concentração na solução do solo, (PATRA et al., 2004; COSIO et al., 2005; SOUZA, 2009). Além disso, estes elementos contaminantes permanecem por um longo período de tempo no ambiente, pois não degradam e dificilmente são metabolizados pelos seres vivos. Desse modo, os metais tóxicos acumulados podem proporcionar riscos ao equilíbrio da comunidade ecológica, uma vez que podem entrar na cadeia alimentar pelo consumo de plantas acumuladoras (NICHOLSON et al., 2003; AZEVEDO et al.,

2012). Ademais, a toxicidade dos metais tóxicos para os vegetais é relativa conforme o metal, concentração disponível, especificidade, forma química, composição e pH do solo e espécie vegetal (NAGAJYOTI et al., 2010).

## 2.2 Cádmi

O cádmio foi descoberto em 1817 por Stromeyer como uma impureza do carbonato de zinco. Pertence ao grupo II B da tabela periódica, juntamente com Zn e Hg. Devido às suas propriedades físico-químicas, se apresenta como um elemento metálico altamente estável, resistente ao calor, ao frio e à luz. Logo, é amplamente utilizado em revestimentos de materiais contra a corrosão, em ligas metálicas, na formulação de pigmentos, na fabricação de baterias, em estabilizadores para plásticos polivinílicos, nas indústrias automotivas e de vidro, dentre outros (PRASAD, 1995; SANITÁ DI TOPPI; GABRIELLI, 1999).

Este elemento metálico tem sido classificado em sétimo lugar na lista dos 20 compostos mais tóxicos existentes na natureza (AL-KEDHAIRY et al., 2001). Pois, é altamente tóxico para animais e muitas espécies vegetais, mesmo em concentração muito baixa (PINTO et al., 2004). Ocorre na crosta terrestre em baixas concentrações, geralmente associado ao Zn em depósitos de sulfeto. Cd pode ser adicionado ao solo por ações antropogênicas, como mineração, utilização de combustíveis fósseis, produção de pigmentos, montagem e descarte indevido de baterias, uso de fertilizantes e pesticidas, adubação com lodo de esgoto e indústrias de galvanoplastias (KIRKHAM, 2006; GUIMARÃES et al., 2008).

O aumento da disponibilidade de Cd no solo também ocorre por meio de fontes naturais pela ação do intemperismo em rochas que possuem altas concentrações desse metal como xisto, calcário e arenito ou no afloramento de materiais geológicos oriundos de plantas (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010). Além disso, Cd é um metal altamente solúvel em água e extremamente móvel e altamente tóxico em plantas, embora não se tenha conhecimento de sua função fisiológica para plantas e animais (MA et al., 2003).

No solo, Cd é encontrado na forma divalente ( $Cd^{+2}$ ), apresentando baixo coeficiente de adsorção e alta mobilidade no sistema solo-planta (CLEMENS; MA, 2016). Como as plantas não possuem um sistema específico para

absorção de Cd, este metal é absorvido pelo sistema radicular via transportadores de elementos divalentes essenciais à nutrição da planta, pela semelhança de suas características físicas (AHSAN et al., 2009). Por sua alta solubilidade em água, é facilmente absorvido e acumulado pelas plantas, afetando fortemente o seu crescimento e a sua produtividade (BENAVIDES et al., 2005; DALCORSO et al., 2008).

A biodisponibilidade deste metal no solo é controlada pela presença de matéria orgânica, pelo potencial redox, pela concentração de outros elementos essenciais para as plantas e, principalmente, pelo pH (DONG et al., 2006), uma vez que a diminuição do pH do solo aumenta a concentração de Cd nas plantas. Nos solos, o Cd geralmente está presente em concentrações muito baixas (média entre 0,1 - 0,5 mg Cd dm<sup>-3</sup> solo) (BAKER; TRACY, 2008). No entanto, na agricultura, a poluição por Cd e seu aumento na concentração do solo é devido ao uso intensivo de fertilizantes fosfatados, atingindo altas concentrações (150 mg Cd dm<sup>-3</sup> solo) em locais contaminados (VISIOLI et al., 2010).

Os solos com concentrações de Cd variando de 0,32 a 1 µM são classificados como moderadamente poluídos (SANITÁ DI TOPPI; GABRIELLI, 1999), enquanto que a água, destinada ao consumo humano, as atividades de pesca ou irrigação de vegetais e árvores frutíferas, pode conter até 0,001 mg Cd L<sup>-1</sup>. Estima-se que cerca de 30.000 toneladas de Cd sejam descarregadas anualmente no meio ambiente por meio de atividades humanas (CONAMA, 2005).

O acúmulo de Cd nos tecidos vegetais aumenta o risco de contaminação por meio de a cadeia alimentar, tanto em humanos como em animais (DICKINSON; PULFORD, 2005). As principais rotas de contaminação por Cd em seres humanos são inalação e ingestão (LIN; LIN, 2005). As principais fontes dietéticas de Cd para a população humana são cereais (arroz e trigo), batatas, vísceras (especialmente fígado e rim) e mariscos. A vida média de Cd no corpo humano varia de 10-30 anos e cerca de 50 a 75% são absorvidas e depositadas em rins, fígado e ossos, impedindo que esses órgãos atinjam adequadamente suas funções metabólicas (BERNARD; LAUWERYS, 1984; IL'YASOVA; SCHWARTZ, 2005). A exposição ao Cd tem sido associada a numerosos efeitos adversos para a saúde humana, com alterações patológicas

distintas em vários tecidos e órgãos, incluindo o desenvolvimento ou progressão de complicações renais, diabéticas, hipertensão, osteoporose, leucemia, infertilidade e câncer em vários órgãos como rins, pâncrea, pulmões, bexiga, mama e próstata (SATARUG et al., 2003; JÄRUP; ALFVÉN, 2004; IL'YASOVA; SCHWARTZ, 2005; HANSSON et al., 2005; BENAVIDES et al., 2005).

### 2.3 Manganês

Manganês (Mn) é um micronutriente necessário para o crescimento e o desenvolvimento normal das plantas (GOUSSIAS et al., 2002; NICKELSEN; RENGSTL, 2013). Nas plantas, Mn está envolvido em processos que incluem fotossíntese, respiração, síntese de proteínas e ativação hormonal (BURNELL et al., 1998). Por exemplo, Mn desempenha um papel importante na maquinaria fotossintética que envolve o complexo de evolução de oxigênio, catalisando a reação de oxidação da molécula de água em nível de PS2 (SCHMIDT et al., 2016), que fornece os elétrons necessários para a fotossíntese (WHITE; GREENWOOD, 2013). Este mecanismo tem-se mostrado útil no diagnóstico de deficiência de Mn, por meio de efeitos sobre a emissão de fluorescência da clorofila (SCHMIDT et al., 2013). No entanto, seu excesso também pode ser prejudicial para o aparato fotossintético (MUKHOPADHYAY; SHARMA, 1991). Desta forma, Mn apresenta dois papéis essenciais nos processos metabólicos dos vegetais, um como micronutriente essencial e outro como elemento tóxico quando em excesso (DUCIC; POLLE, 2005).

Manganês também é necessário para múltiplos processos na síntese de carboidratos, lipídios e lignina em plantas (MARSCHNER, 2012). Além disso, está envolvido na ativação de mais de 30 enzimas. Algumas enzimas, como a dismutase do superóxido dependente de Mn (MnSOD) e tem Mn como seu cofator enzimático (BROADLEY et al., 2012). Este elemento metálico atua como cofator direto de uma variedade de enzimas que incluem descarboxilases do ciclo do TCA, RNA polimerases e numerosas glicosil transferases. Em algumas enzimas, outros metais podem substituir Mn como um cofactor enzimático (HEBBERN et al., 2009).

A absorção de Mn pelas plantas depende do seu estado de oxidação no solo. Embora Mn possa existir em uma faixa de estados de oxidação ( $Mn^{1+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mn^{3+}$ ,  $Mn^{4+}$ ,  $Mn^{6+}$  e  $Mn^{7+}$ ), as formas mais comumente encontradas em sistemas biológicos são  $Mn^{2+}$ ,  $Mn^{3+}$  e  $Mn^{4+}$ , tendo  $Mn^{4+}$  como o menos estável (MARSCHNER, 2012). O estado de oxidação de Mn mais solúvel no solo é o cátion divalente ( $Mn^{2+}$ ), que, também, é a forma de Mn mais eficientemente acumulada em plantas (MARSCHNER, 2012). Em baixas concentrações, normalmente presente como  $Mn^{2+}$  na solução do solo, Mn é um nutriente essencial para todas as culturas, ao passo que em altas concentrações se torna um elemento metálico tóxico para as plantas, principalmente em solos ácidos (PENDIAS; PENDIAS, 1992). Pois, o pH do solo é um dos principais determinantes do estado de oxidação de Mn (MARSCHNER, 2012). O teor total de Mn nos solos é variável, com quantidades oscilando entre 20 a 10.000 mg  $Mn\ kg^{-1}$  solo (SPARKS, 1995). A toxicidade de Mn é, provavelmente, o principal fator limitante do crescimento de plantas cultivadas após o alumínio ( $Al^{3+}$ ), principalmente em áreas ácidas subtropicais e tropicais (LE BOT et al., 1990). Por outro lado, plantas deficientes em Mn também são caracterizadas por necrose tissular devido à diminuição da atividade da enzima Mn-SOD e, conseqüentemente, aumento das espécies reativas de oxigênio (ALLEN et al., 2007; MARSCHNER, 2012).

#### 2.4 Toxicidade de Cd em plantas

Entre os metais tóxicos o Cd é o mais fitotóxico, causando ruptura no organismo mesmo em baixas concentrações (CHAKRAVARTY; SRIVASTAVA, 1992; DAS et al., 1997; ZACCHINI et al., 2009). Por sua característica séssil, todos os órgãos das plantas respondem aos diferentes estresses bióticos e abióticos (SCHÜTZENDÜBEL; POLLE, 2002; RODRÍGUEZ-SERRANO et al., 2009). As respostas são diferenciadas e complexas, uma vez que diferentes espécies vegetais apresentam capacidades diferentes para acumular Cd nos tecidos (VASSILEV et al., 2002).

Devido à sua rápida absorção pelas raízes e à sua translocação e acúmulo em tecidos vegetais, o estresse é observado na maioria das plantas, quando exposto a concentrações fitotóxicas de Cd (ALMEIDA et al., 2007;

RODRÍGUEZ-SERRANO et al., 2009; SOUZA et al., 2009). Uma vez no interior da planta, o acúmulo de Cd promove mudanças em diferentes processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, modificando atividades metabólicas (ZHANG et al., 2010). O primeiro efeito fitotóxico do Cd nas plantas é indireto, afetando a abertura estomática devido ao aumento do potencial osmótico da folha (BENAVIDES et al., 2005). Além disso, promove mudanças na parte aérea e no crescimento das raízes, interfere na biossíntese da clorofila, aumenta a atividade de certas enzimas, diminui as taxas de transpiração e fotossíntese e também a condutância estomática e induz a senescência prematura e a clorose foliar (SOARES et al., 2005; CALLAHAN et al., 2006; CLEMENS, 2006; ALMEIDA et al., 2007; PIETRINI et al., 2010). A redução da taxa fotossintética líquida e as alterações na atividade enzimática causam diminuição no crescimento e na produtividade da planta (MACFARLANE; BURCHETT, 2001; ALMEIDA et al., 2007; ZHANG et al., 2010).

Cádmio, além de ser altamente móvel no floema, pode se acumular em certas partes da planta e promove (i) alterações morfológicas e ultraestruturais em folhas e raízes (SOUZA et al., 2011), (ii) clorose (CHAFFEL et al., 2004) e epinastia de folhas (ZHAO et al., 2006), (iii) lignificação da parede celular nos tecidos das raízes e das folhas, (iv) redução da fotossíntese líquida, condutância estomática e transpiração da folha (SOUZA et al., 2011), (v) inibição de fotossíntese pela diminuição da transcrição de *psbA*, *rbcl* e *psaB*, genes relacionados à fotossíntese (QIAN et al., 2010), (vi) inativação de enzimas envolvidas na fixação de CO<sub>2</sub> (PERFUS-BARBEOCH et al., 2002), (vii) peroxidação lipídica (LASPINA et al., 2005; IANNONE et al., 2010), (viii) alteração na absorção de nutrientes, (ix) alterações morfológicas típicas da apoptose nos núcleos de pontas radiculares e células foliares (SOUZA et al., 2011), (x) indução da morte celular programada (SOUZA et al., 2011), (xi) aprimoramento da proteólise (PENA et al., 2007) e distúrbio no metabolismo de N e S e das máquinas antioxidantes de plantas (GRATÃO et al., 2008; GILL; TUTEJA, 2011), (xii) mudanças no equilíbrio hídrico e inibição do crescimento devido à redução da concentração de clorofila e inibição da síntese de clorofila, abertura estomática e escurecimento de raízes (SOARES et al., 2005; GARNIER et al., 2006; RODRÍGUEZ -SERRANO et al., 2009), (xiii) alterações na fosforilação oxidativa (KESSELER; BRAND, 1995), (xiv) inibição da divisão



celular e alterações nos cromossomos (SOBKOWIAK; DECKERT, 2003), (xv) inibição da atividade enzimática por ligação a grupos sulfidrilas (LAGRIFFOUL et al., 1998) e (xvi) alterações no metabolismo da germinação da semente (RAHOUI et al., 2010; SMIRI et al., 2010).

A alta concentração de Cd no vacúolo provoca o estresse oxidativo, seja pela produção de radicais livres de oxigênio ou pela diminuição dos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (DAS et al., 1997). As principais enzimas do sistema antioxidativo afetadas pelo Cd são a catalase e a dismutase do superóxido. A interferência de Cd no sistema de defesa antioxidativo não enzimático envolve a diminuição da concentração de glutatona, devido ao aumento da sua utilização na síntese de fitoquelatinas, ou o transporte do metal para o vacúolo, o que favorece o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células (PIETRINI et al., 2003).

As EROs (radical superóxido -  $O_2^-$ ; peróxido de hidrogênio -  $H_2O_2$ ; radical hidroxila -  $OH^\cdot$ , dentre outros), em concentrações elevadas, podem ser extremamente prejudiciais às plantas, podendo oxidar proteínas, lipídios, ácidos nucléicos e até alterar a estrutura celular e provocar mutagênese (VITÓRIA et al., 2001). A degradação da clorofila (NAGALAKSHMI; PRASAD, 2001; GUELFY et al., 2003), afetam a integridade funcional e estrutural de membranas biológicas e reduzem o crescimento e a produtividade. Dependendo do tempo de exposição e da quantidade acumulada de ERO's, levam a planta à morte (SHAH et al., 2001; ROMERO-PUERTAS et al., 2004; LIU et al., 2007).

No interior das células vegetais, as respostas moleculares contra o estresse induzido por Cd alteram o metabolismo da planta em relação à proteção direta, que envolvem o sequestro do metal por biomoléculas, sinalização celular e ativação de genes que codificam um grande número de proteínas (SANITÀ DI TOPPI E GABBRIELLI, 1999; ALMEIDA et al., 2007; DALCORSO et al., 2010). Esses são mecanismos que diminuem a absorção e a translocação de Cd, sequestram ou se ligam ao metal promovendo a redução de interações de Cd prejudiciais aos compostos celulares ou mesmo diminuem o efeito fitotóxico deste metal (LIN; AARTS, 2012).

As respostas aos estresses abióticos estimulam a síntese de proteínas de estresse e moléculas de sinalização (SANITÀ DI TOPPI; GABBRIELLI,

1999), bem como fatores de transcrição que regulam esta expressão (ZHANG et al., 2005; AMUDHA; BALASUBRAMANI, 2011). Diferentes fatores de transcrição ajudam a regular a expressão de vários genes, afetando a resposta da planta aos estresses abióticos (ZHANG et al., 2005, AMUDHA; BALASUBRAMANI, 2011). Assim, há uma alteração no perfil proteico de plantas submetidas à exposição a metais tóxicos, incluindo Cd.

## 2.5 Mecanismos de respostas das plantas ao estresse por Cd

A maioria das espécies vegetais conhecidas como acumuladores de metais tóxicos é herbácea. Entretanto, as árvores têm maior capacidade de absorção destes metais, principalmente àquelas de crescimento rápido, considerando sua alta produção de biomassa e seu sistema radicular profundo, que pode explorar um maior volume de solo (PILON-SMITS, 2005; ALMEIDA et al., 2007; ZACCHINI et al., 2009). Plantas conhecidas como excludentes, possuem mecanismos especializados para reduzir a entrada de metais tóxicos nas raízes. Estas plantas previnem a entrada de metais no citosol por meio da exsudação de compostos quelantes de metais, pela ação da membrana plasmática. Compostos como malato, citrato e oxalato têm sido identificados como importantes quelantes secretados pelas raízes (LASAT, 2002).

As plantas apresentam alguns mecanismos de tolerância a altas concentrações de Cd. Plantas tolerantes mostram um aumento nos mecanismos homeostáticos, que contribuem para evitar a translocação de metais ou mantê-los em uma forma estável. As estratégias para evitar a translocação de metais tóxicos são várias, dentre as quais incluem: (i) restrição do movimento do metal às raízes por micorrizas, (ii) ligação do metal à parede celular (BENAVIDES et al., 2005; VÁZQUEZ et al., 2006), (iii) redução do influxo através da membrana plasmática, envolvendo canais de Ca (RIVETTA et al., 1997), (iv) efluxo ativo para o apoplasto (VAN BELLEGHEM et al., 2007), (v) agentes de quelação de metal no citosol (HALL, 2002), (vi) reparação e proteção da membrana plasmática, (vii) transporte do complexo de fitoquelatina-Cd para o vacúolo, (viii) transporte e acúmulo de metais no vacúolo (GRATÃO et al., 2005a), e (ix) distribuição restrita do metal em tecidos susceptíveis, ligando o metal à parede celular (GRATÃO et al., 2005b).

A primeira barreira contra o excesso de Cd no meio ocorre, principalmente, nas raízes das plantas, onde este pode ser imobilizado por meio da parede celular e dos carboidratos extracelulares, como mucilagem e calose. Este processo evita a presença de íons livres nos tecidos radiculares e a translocação para a parte aérea das plantas (WAGNER, 1993). Além disso, um papel muito importante na desintoxicação e tolerância ao Cd é a compartimentalização vacuolar, que impede o movimento de íons Cd livres no citosol e os obriga a entrar em uma área limitada (SANITÀ DI TOPPI; GABRIELLI, 1999).

A quelação é um dos mecanismos mais importantes de tolerância ao Cd em um grande número de espécies vegetais (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). Este processo ocorre pela ação de glutathione (GSH) ou das fitoquelatinas (PCs) que representam um mecanismo comum de desintoxicação deste metal tóxico. Os agentes quelantes incluem nicotianamina, aminoácidos, ácidos orgânicos, peptídeos e proteínas, especialmente duas classes de peptídeos: fitoquelatinas (PC) e metalotioneínas (MT).

A glutathione (GluCysGly, GSH) é um importante antioxidante celular, com múltiplas funções, como redox-homeostática, tampão, sinalização e reações de defesa encontradas em muitos organismos, incluindo plantas (NOCTOR et al., 2011). A glutathione pode formar complexos com muitos metais e é o precursor de fitoquelatinas (PC) (VERBRUGGEN et al., 2009). As PCs são quelantes de baixo peso molecular, utilizadas como principais estratégias pelas plantas para reduzir os efeitos de metais não essenciais, como Cd (TRAN; POPOVA, 2013). Além disso, são compostos de polipeptídeos com estrutura geral de  $(\alpha\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ , onde n varia de 2 a 11. Devido à presença do grupo de tiol de cisteína, as PCs podem quelar Cd, protegendo o citosol de íons Cd, movendo-os para os vacúolos. A síntese de PCs ocorre pela enzima sintetase da fitoquelatina, que é ativada na presença de metais (GALLEGO et al., 2012). Por outro lado, as metalotioneínas (MTs), parte de outra classe de quelantes de metais, são proteínas ricas em cisteína que inativam íons metálicos formando complexos MT-metal. As MTs são produtos da tradução de mRNA que são expressas em resposta a diferentes tipos de estresses abióticos (GALLEGO et al., 2012).

Associado ao mecanismo de complexão, a compartimentalização de Cd é outro importante mecanismo de tolerância. Após a complexão de Cd com substâncias consideradas queladoras, o produto formado (Cd-quelador) é armazenado em estruturas celulares e, ou subcelulares como vacúolo, reduzindo sua concentração no citosol e nos organelos, onde se concentram as enzimas do metabolismo primário, evitando a desnaturação das mesmas e a redução de sua atividade enzimática (KUPPER et al., 2007). No entanto, a importância desses mecanismos pode variar de acordo com a concentração de Cd fornecido, as espécies envolvidas, o tempo de exposição, dentre outros (SANITÀ DI TOPPI; GABRIELLI, 1999).

## 2.6 Mitigação da toxicidade de Cd

A crescente preocupação com Cd como metal tóxico, não se deve apenas aos efeitos prejudiciais sobre a produção agrícola, mas também aos potenciais riscos à saúde humana associada à contaminação da cadeia alimentar (HALL, 2002; MOBIN; KHAN, 2007; AJJIMAPORN et al., 2012). Isto, porque Cd não é um nutriente essencial, mas é facilmente absorvido pelas plantas devido à especificidade flexível dos canais iônicos e dos transportadores de metais divalentes (LIU et al., 2003).

Alguns trabalhos têm demonstrado diminuição na absorção e no acúmulo de Mn nas raízes e parte aérea em diferentes espécies vegetais cultivadas em meio contendo Cd (JALIL et al., 1994; YANG et al., 1998; WU et al., 2003). Por outro lado, tem-se observado, para várias espécies vegetais, que baixa concentração de Cd promove aumento no acúmulo de Mn na parte aérea (HERNÁNDEZ et al., 1996; RAMOS et al., 2002) e que uma adequada nutrição com Mn pode estar associada com a redução paralela da absorção de Cd (JARVIS et al., 1976; PAL'OVE-BALANG et al., 2006).

O decréscimo da concentração de Cd em plantas, após a adição de Mn, e vice-versa, pode ser explicado pela competição para os mesmos transportadores de membrana (PAL'OVE-BALANG et al., 2006). Em função do sequenciamento de alguns genomas vegetais, muitos transportadores de metal multiespecíficos foram identificados e descritos. Os genes NRAMP e IRT1 codificam proteínas integrais de membranas que podem transportar Mn, bem

como outros metais, a exemplo de Cd (THOMINE et al., 2003; COHEN et al., 2004). Altas concentrações de Mn em *Lupinus albus*, uma espécie hiperacumuladora de Mn, contribuiu para a redução dos efeitos negativos de Cd, especialmente em nível de fotossíntese (ZORNOZA et al., 2002). Observou-se, também, um acúmulo maior de Mn em cloroplastos de *Lactuca sativa* na presença de Cd no meio de crescimento (RAMOS et al., 2002). Além disso, a restauração parcial da estrutura do cloroplasto, danificada pela toxidez de Cd, foi observada após a adição de Mn (BASZYŃSKI et al., 1980).

## 2.7 Estudo proteômico de resposta ao estresse por Cd

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

A maioria dos estudos analisando os efeitos de metais tóxicos por meio da técnica de eletroforese bidimensional (2-DE) foram realizadas em *Oryza sativa* e *Arabidopsis*, plantas modelo de mono e dicotiledôneas (AHSAN et al., 2009; AGRAWAL et al., 2012). Portanto, ainda existe um grande universo a ser explorado, principalmente estudos que busquem compreender as respostas ao estresse de plantas de interesse comercial. Para evitar perdas na produção, são utilizadas técnicas como a aclimação, que ocasiona profundas alterações na expressão gênica, resultando em transcritos, proteínas e metabólitos diferenciais, na tentativa de a planta suportar e sobreviver aos diferentes estresses bióticos e abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2017).

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

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

A resposta oxidativa nas plantas pode ser aumentada por condições estressantes (GRATÃO et al., 2005). Em nível molecular, a extensão e natureza dessa resposta difere entre espécies e mesmo entre variedades estreitamente relacionadas da mesma espécie. Neste contexto, Cd é um dos metais mais tóxicos, o que afeta o crescimento e o desenvolvimento de plantas, induzindo ao estresse oxidativo, resultando em uma variedade de respostas antioxidantes (GRATÃO et al., 2008). O estresse oxidativo também afeta a abundância de proteínas, e a análise proteômica comparativa fornece uma ferramenta poderosa para identificar as proteínas expressas sob estresse biótico e abiótico (XU et al., 2010).

As proteínas de choque térmico (HSPs) são atualmente conhecidas como proteínas que têm funções para resistir ao estresse em eucariotos. Nas plantas de *Zea mays* tratadas com Cd, Reddy e Prasad (1993) apresentaram síntese de fosfoproteína de 70 kDa (HSP). Em *Lycopersicon peruvianum*, o tratamento com um curto estresse térmico, antes da exposição ao Cd, induziu um efeito protetor ao prevenir danos às membranas. As proteínas HSP17 (peso molecular 17 kDa) e HSP70 também foram encontradas no citosol de células com choque térmico (NEUMANN et al., 1994). Em plantas de *Pisum sativum* tratadas com Cd, foram encontradas proteínas PrP4A e HSP71 relacionadas ao patógeno que, provavelmente, servem para proteger as células contra danos induzidos por Cd (RODRÍGUEZ-SERRANO et al., 2009).

Em *Populus tremula*, a abundância de muitas proteínas típicas relacionadas ao estresse, como HSPs ou glutathione-S-transferases, foi aumentada, enquanto a maioria das proteínas do metabolismo primário (glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico, metabolismo do nitrogênio e metabolismo do enxofre) foram severamente diminuídas (KIEFFER et al., 2009). Lee et al. (2010) relataram que Cd afetou a síntese de 36 proteínas em

*O. sativa*. De acordo com estes autores, os níveis de glutathione total foram significativamente diminuídos nas raízes tratadas com Cd e, aproximadamente, metade das proteínas reguladas positivamente nas raízes estava envolvida nas respostas ao estresse oxidativo. Estes resultados sugerem que respostas antioxidativas imediatas podem ser necessárias para a redução do estresse oxidativo induzido por Cd em raízes. Em plantas de *Solanum lycopersicum* submetidas à baixa (10  $\mu$ M) e à alta (100  $\mu$ M) concentração de Cd, houve indução de 36 e 41 polipeptídios, respectivamente (RODRÍGUEZ-CELMA et al., 2010).

Em *T. cacao*, no trabalho de Araújo (2017), houve uma abundância de proteínas relacionadas ao metabolismo energético, à fotossíntese, ao metabolismo antioxidativo e às respostas aos estresses abióticos quando estas plantas foram expostas ao estresse hídrico e doses de K. Dentre estas proteínas destaca-se SOD e GPX.

Uma variedade de proteínas foi e ainda podem ser identificadas e relacionadas à tolerância e a sensibilidade de plantas ao estresse por Cd e outros metais tóxicos, por meio de estudos que abordam a comparação de alterações no proteoma de espécies relacionadas, revelando respostas contrastantes às condições estabelecidas (FRANCO, 2013). De acordo com Kosová et al. (2011), as revelações proteômicas podem influenciar na confecção de novos biomarcadores de tolerância, por meio de análise de genomas, permitindo encontrar alelos específicos correspondentes às proteínas individuais que podem ser relacionados a uma variação fisiológica. Segundo estes autores, esses dados podem ser utilizados por programas de melhoramento de plantas, que visam o aumento da tolerância ao estresse.

## 2.8 *Theobroma cacao* e a presença de Cd no cacau

Trata-se de uma espécie lenhosa típica de clima tropical, diplóide ( $2n = 20$ ), preferencialmente alógama, perene e, dentre as 22 espécies que compõem o gênero, apenas o cacau e o cupuaçu são explorados comercialmente no Brasil (ALMEIDA; VALLE, 2007). Em condições de cultivo, geralmente chega a 5 m de altura, podendo atingir até 20 m quando em condições silvestres (BARTLEY, 2005).

A espécie apresenta alta variabilidade genética para características fisiológicas e morfológicas (DAYMOND et al., 2002; BARTLEY, 2005). Entre os genótipos de cacau, CCN 51 é altamente produtivo, cultivados por grande número de produtores de cacau, além de ser auto-compatível, resistente a vassoura de bruxa, apresenta sementes grandes com maior teor de gordura (manteiga de cacau) em relação aos genótipos cultivados, o que agrega maior valor econômico às suas amêndoas (sementes fermentadas) (BOZA et al., 2014).

Atualmente, existe uma grande preocupação com os tipos de solos onde se cultiva cacau, devido, principalmente, à presença de metais tóxicos, em especial o Cd, que são absorvidos do solo pelas plantas de cacau e acumulados nas sementes de seus frutos (CAOBISCO/ECA/FCC, 2015; ARÉVALO-GARDINI et al., 2017).

A concentração crítica de Cd em amêndoas de cacau, estabelecida pela União Européia é de  $0,6 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$  (MOUNICOU et al., 2003). No entanto, existem estudos que mostram que as amêndoas de cacau produzidas na América Latina, quando comparado com as de países africanos, excedem esse limite, suscitando preocupações com a saúde humana (HUAMANI-YUPANQUI et al., 2012). Um estudo recente no Equador demonstrou a presença de Cd em amêndoas de cacau e nos solos cultivados (CHAVEZ et al., 2015). Além da rocha de origem, responsável pela formação do solo, a aplicação de fertilizantes fosfatados é considerada uma das principais fontes de Cd em solos agrícolas, que pode ser superior a  $130 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ solo}$  (JIAO et al., 2012; CHÁVEZ et al., 2015). Por outro lado, Mn é dos micronutrientes essenciais mais exigidos pelas plantas de cacau, sendo absorvido pelas raízes, principalmente como cátion divalente ( $\text{Mn}^{2+}$ ). Além disso, é o micronutriente mais acumulado nas folhas (SOUZA JÚNIOR, 1997; DANTAS, 2011) e o mais exportado para a casca e sementes do fruto de cacau (PINTO, 2013).

Manganês, assim como o Cd, é absorvido como cátion divalente, competindo pelos mesmos transportadores de íons. Logo, a maior disponibilidade de Mn para as plantas de cacau, em solos contaminados por Cd, pode reduzir a absorção de Cd, em detrimento da absorção de Mn pelas raízes, e evitar ou minimizar o transporte de Cd para a parte aérea e, conseqüentemente, o seu acúmulo nas amêndoas de cacau, mitigando, desta



forma, a toxicidade de Cd (BARROSO, 2018). Portanto, faz-se necessário estudo para elucidar o processo de mitigação da toxicidade de Cd por Mn, em genótipos clonais e seminais de cacau, de modo a reduzir os riscos à saúde, devido ao acúmulo de Cd nas amêndoas e consequente contaminação do chocolate, e de outros produtos derivados do cacau, por esse metal.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi conduzido na casa de vegetação da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, Brasil. Foram utilizadas plantas jovens seminais do genótipo de cacau CCN 51, resultantes de autofecundação de flores de plantas adultas com 5 a 8 anos de idade, oriundas do banco ativo de germoplasma do CEPEC/CEPLAC, Ilhéus, BA. Após a coleta dos frutos maduros, as sementes foram cultivadas em vasos plásticos perfurados, com capacidade de 5 kg de substrato com solo franco-arenoso e fertilizado com base na recomendação de adubação feita a partir da análise do solo.

Antes da semeadura, amostras do substrato foram coletadas para análises químicas e físicas, para proceder à correção e a recomendação de adubação pertinente. Posteriormente, quando as plantas estavam com 4 meses de idade, foram aplicados os tratamentos de Cd e, ou Mn no solo, com as concentrações: 0 (controle, sem adição de Cd e Mn no solo), 0,8 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo, 1,6 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo e a combinação de 0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo, tendo como fonte cloreto de cádmio e cloreto de manganês.

#### 3.2 Análise proteômica

##### 3.2.1 Extração de proteínas totais de amostras foliares e radiculares

Para extração de proteínas totais, foram usadas um *pool* de todas as 10 repetições das amostras foliares e radiculares liofilizadas do genótipo de cacau CCN 51 submetidos a doses de Cd, Mn e Cd+Mn no solo, seguindo o protocolo desenvolvido por Pirovani et al. (2008) e adaptado para raízes (Bertolde et al., 2014). Inicialmente, foi macerado 1 g de biomassa liofilizada das amostras, usando nitrogênio líquido e 0,07g de polivinilpirrolidona (PVPP), com almofariz e pistilo, até atingir a textura de pó fino. Após a maceração, as amostras foram distribuídas em *ependorfs* de 2 mL, para que fossem submetidas às lavagens. Em seguida, o material foi lavado com acetona a 100% em folhas e TCA a 10% em acetona (a frio) e 0,07% de 2-mercaptoetanol em raízes, e centrifugado a

14.000 x g por 10 min a 4°C, cujo passo foi repetido seis vezes. Entre uma lavagem e outra, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições iniciais e o sobrenadante descartado. Posteriormente, o *pellet* foi seco em temperatura ambiente por 1 h. Em seguida, o *pellet* foi lavado com ácido tricloroacético (TCA) a 10% em acetona, contendo 2-mercaptoetanol a 0,07%. As lavagens foram repetidas até que as amostras foliares perdessem a coloração. Em raízes foi lavado três vezes com o mesmo volume de acetona fria e 2-mercaptoetanol a 0,07%. Entre uma lavagem e outra, as amostras foram centrifugadas, nas mesmas condições do passo anterior, e homogeneizadas com o uso de vortex. Logo após, foram feitas lavagens com TCA a 10% em água, seguida de homogeneização por sonicação (8 pulsos de 5 s, amplitude de 70%, com intervalos de 10 s) no ultraprocessador (Gex 130, 130 W) e posterior centrifugação para descarte do sobrenadante. Esta etapa foi repetida duas vezes e, ao final, foi realizada uma primeira precipitação por aproximadamente 1 h a 20 °C, usando as mesmas condições de centrifugação. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as amostras submetidas a lavagens com acetona a 80% por três vezes. A cada lavagem, o precipitado foi ressuspenso com o uso do vortex e sonicado quando necessário. Na última lavagem, o sobrenadante fora descartado e o *pellet* seco a temperatura ambiente. Posteriormente, o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de tampão de extração SDS denso (30% de sacarose, SDS a 2%, Tris-HCl (0,1 M e pH 8,0) e 2-mercaptoetanol a 5%). Em seguida, a amostra foi submetida a sonicação em gelo (4 pulsos de 10 s, amplitude de 70%, com intervalos de 10 s), seguida da adição de 1 mL de fenol saturado, pH 8,0. Logo após, a amostra foi centrifugada a 10000 x g a 4 °C, durante 15 min. O sobrenadante foi então transferido para um tubo novo e armazenado em gelo. As fases de fenol foram agrupadas e incubadas durante a noite a - 20 °C, com cinco volumes de acetato de amônio a 0,1 M em metanol. O sedimento foi gerado por meio de centrifugação a 14.000 x g a 4 °C, durante 20 min. Em seguida, as proteínas foram lavadas duas vezes com acetato de amônio a 0,1 M em metanol e duas vezes com acetona 80%. Durante cada ciclo de lavagem, a amostra foi centrifugada a 14.000 x g a 4 °C, durante 5 min. Finalmente, os *pellets* foram secos à temperatura ambiente. Em seguida, o pellet foi ressuspenso em 400 µL de tampão de reidratação (Ureia 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS a 2%, Azul de

Bromofenol a 0,002%). No final, as proteínas das amostras foliares foram estocadas em freezer a - 20 °C até o momento de seu uso.

### 3.2.2 *Quantificação de proteínas totais e eletroforese em SDS-PAGE*

Os extratos proteicos obtidos foram quantificados com o 2D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences), seguindo as recomendações do fabricante. O padrão utilizado foi diferentes concentrações de albumina do soro bovina (BSA), que serviu como base para gerar uma curva padrão de dosagem para a quantificação das amostras foliares e radiculares de cacau. Tanto a curva quanto as amostras foram preparadas em triplicata, usando microtubos do tipo *ependorf* de 2 mL. Inicialmente, foi adicionado a todos os microtubos (padrão e amostras) 100 µL de solução precipitante. Logo após, foram adicionados 2 µL das amostras ressuspensas em tampão de reidratação e as concentrações correspondentes do padrão aos microtubos da curva, sendo brevemente homogeneizados em vortex. Seguiu-se as recomendações do fabricante para sua utilização. Logo após, as amostras foram analisadas e observadas por mini gel SDS-PAGE (Dodecil Sulfato de Sódio - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida) em minicubas de eletroforese (Omniphor), com géis de 8 x 10 cm, contendo 12,5% de acrilamida de acordo com Laemmli (1970), onde foi corado com Comassie coloidal 0,08 % de acordo com Neuhoff et al. 1988. Foram utilizados 10 µg de cada amostra e a partir deste gel foi possível observar o perfil de bandas de proteínas totais.

### 3.2.3 *Focalização isoeétrica*

Esta etapa consiste em separar as proteínas pelo seu ponto isoeétrico, ou seja, as proteínas irão migrar por um gradiente até o ponto em que suas cargas líquidas irão se igualar a zero. Para tanto, foi necessário um total de 350 µg de proteínas, previamente solubilizadas em tampão de reidratação, no qual foi adicionado ditioneitol (DTT) a 50 mmol L<sup>-1</sup> e 0,5 % de anfólitos para pH 3-10 não linear (NL) (*Amersham Biosciences*). A esta solução foi adicionado mais tampão de reidratação (quando necessário) até atingir o volume de 250 µL. Logo após, as amostras proteicas, em triplicatas, foram pipetadas em suporte

específico para focalização, os chamados “suporte para tiras em gel” (*strip holder*), de forma que as extremidades positivas e negativas, dentro dos mesmos, fossem conectadas pela solução. Posteriormente, as tiras de gel (*strips*), com gradiente de pH imobilizado 3-10 NL (não linear), 13 cm (*Immobiline Dry Strip Gel*), foram colocadas, com o auxílio de uma pinça metálica, em contato direto com a amostra. Em seguida, foi adicionado 1 mL de óleo mineral (*Dry Strip Cover Fluid*) sobre as *strips* para evitar possível desidratação das mesmas. Os *strip holders* foram transferidos para o equipamento de focalização isoeletrica *Ettan IPGphor III* (*GE Healthcare*), controlado pelo *software Ettan IPGphor III*, com as seguintes configurações: tempo de reidratação de 12 h a 20 °C; condições de corrida: 500 Vh por 1 h, 1000 Vh por 1h4min, 8000 Vh por 2h30min e 8000 Vh por 40 min.

### 3.2.4 SDS-PAGE Bi-dimensional

As *strips*, antes de serem submetidas à corrida eletroforética, foram preparadas, sendo transferidas, ao término da focalização, para tubos de ensaio, onde foram adicionados 7 mL de tampão de equilíbrio [uréia a 6 M, Tris-HCl (75 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,8), glicerol a 30 %, SDS a 2% e azul de bromofenol a 0,002%, contendo DTT a 10 mg mL<sup>-1</sup>], sendo equilibradas por agitação suave durante 15 min. Essa fase ajuda a reduzir as pontes de dissulfeto presentes nas proteínas em conformação terciária e quaternária. A solução contendo DTT foi descartada em recipiente adequado e uma nova solução de tampão de equilíbrio, contendo iodoacetamida a 25 mg mL<sup>-1</sup>, foi adicionada aos tubos de ensaio e então agitadas suavemente por mais 15 min. Nesta etapa, as proteínas serão alquiladas. Novamente, a solução foi descartada e a terceira etapa de equilíbrio foi iniciada, adicionando 7 mL de tampão de corrida 1X (Tris a 0,25 M, glicina a 1,92 M, SDS a 1%, pH 8,5) aos tubos de ensaio, seguido de agitação por 15 min. Posteriormente, foi realizada a etapa da eletroforese em gel de poliacrilamida, onde as proteínas foram separadas de acordo o seu peso molecular. Para este procedimento, os géis foram submetidos à corrida eletroforética em cuba de eletroforese SE 600 *Ruby* (*GE Healthcare*). Os géis de poliacrilamida a 12,5% foram confeccionados em triplicata para cada tratamento, utilizando soluções de acrilamida/bisacrilamida a 30% (29,2 g de

acrilamida e 0,8 g de N-metil-bisacrilamida), tampão de resolução 1X (Tris-HCl a  $0,375 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 8,8, SDS a 0,1%), 60  $\mu\text{L}$  de persulfato de amônio a 10% e 6  $\mu\text{L}$  de TEMED (N,N,N',N'Tetrametiletenodiamina). Após a polimerização, foi transferido, aproximadamente, 1 mL de solução selante de agarose (TRIS Base a  $25 \text{ mmol L}^{-1}$ , glicina a  $192 \text{ mmol L}^{-1}$ , SDS a 0,1%, agarose a 0,5% e azul de bromofenol a 0,002%) aos géis, e sobre esta, um pedaço de papel filtro contendo o marcador de peso molecular *Amersham Low Molecular Weight SDS Calibration Kit for SDS electrophoresis (GE Healthcare)*. Em seguida, as *strips* foram dispostas na parte superior do gel, sendo as extremidades positivas direcionadas a mesma posição. Logo após, adicionou-se, então, mais da solução selante até que esta cobrisse toda a *strip*. Procedeu-se, em seguida, com a montagem da cuba e a adição de tampão de corrida 1X (Tris Base a  $25 \text{ mol L}^{-1}$ , glicina a  $0,192 \text{ mol L}^{-1}$ , dodecil sulfato de sódio – SDS a 1%). Com as *strips* prontas e já na cuba, iniciou-se a corrida, seguindo os seguintes parâmetros: 15 mA/gel por 15 min, 40 mA/gel por 30 min e, por fim, 50 mA/gel por 4 h ou até que ocorresse toda a migração da amostra no gel, que foi acompanhada observando o deslocamento do selante, assim como do marcador no gel. Imediatamente após, os géis foram retirados da cuba e fixados em tampão de fixação (etanol a 40% e ácido acético a 10 %) por 1 h, seguido da retirada do tampão de fixação e adição de corante azul de *coomassie* coloidal (sulfato de amônio a 8%, ácido fosfórico a 0,08%, *Coomassie Blue G-250* a 0,08% e metanol a 20%) (NEUHOFF et al., 1988). Posteriormente, os géis ficaram corando por cinco a sete dias, com o auxílio de um agitador. Passado este período, o corante foi devolvido para reutilização e iniciou-se a etapa de lavagens dos géis com água destilada e autoclavada pelo mesmo período de tempo, sendo realizadas lavagens diárias e quantas vezes fossem necessárias. Depois de descorados, os géis foram imersos em solução de ácido acético a 7%, para conservação dos mesmos até que fossem realizadas as análises seguintes.

### 3.2.5 Análise de géis pelo Software Image Master

Para a análise, os géis foram digitalizados utilizando o *LabScanner (Amersham Bioscience)* e, em seguida, essas imagens foram analisadas para a

detecção da intensidade, volume e abundância relativa dos *spots*, usando o *ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare)*. Este programa considera área e intensidade dos *spots*, permitindo a obtenção dos números de *spots* em cada gel, bem como o nível em que estes *spots* foram expressos, e a caracterização dos valores de ponto isoelétrico e massa molecular. Para cada tratamento, foram feitos três géis (triplicata) e, posteriormente, foi estabelecido um gel de referência para a triplicata. Todos os géis foram sobrepostos e, a partir disso, o programa identificou os *spots* exclusivos e os *spots* diferencialmente acumulados entre os tratamentos para folha e raiz. As análises estatísticas realizadas pelo programa é o teste estatístico ANOVA considerando-se valores de  $p \leq 0,05$ .

### 3.2.6 Preparação de spots para Espectrometria de massas

Os *spots* de proteínas selecionados de cada tratamento foram excisados do gel bi-dimensional e fragmentados com o auxílio de um bisturi. Logo após, foram equilibrados com 200  $\mu\text{L}$  acetonitrilo a 50%, contendo bicarbonato de amônio a 25 mM, para remover a mancha azul de *Coomassie*, e enxaguados com 200  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q. Logo após, os geis excisados foram desidratados em 100  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo a 100% por 10 min, a temperatura ambiente. Logo após, foram secos usando centrifuga a vácuo no Concentrator 5301 (*Eppendorf*) por 20 min e digeridos com 4  $\mu\text{L}$  de tripsina Promega Gold (25 ng/mL), 40-50  $\mu\text{L}$  bicarbonato de amônio a 25 mM, a 4 °C por 10 min, para absorção da mesma nos fragmentos de gel. Feito isso, foi adicionado uma solução de bicarbonato de amônio a 25 mM até cobrir o gel, seguido de incubação *overnight* a 37 °C, para ação da tripsina. Posteriormente, os fragmentos trípticos foram eluídos a partir de gel de sílica com acetonitrilo a 50% e ácido fórmico a 5% por duas vezes, sob agitação durante 30 min em termomix Thermo Finemixer (SH2000-DX). Ao final de cada lavagem, os sobrenadantes foram adicionados aos tubos *eppendorfs* novos. Ao término da extração, as amostras foram secas sob vácuo até atingir um volume de 15  $\mu\text{L}$ .

### 3.2.7 Espectrometria de massas (MS)

A solução protéica digerida foi então fracionada numa coluna de permuta iônica. Posteriormente, os fluidos de digestão foram fracionados numa coluna de fase inversa C18, utilizando duas fases móveis: fase A, contendo H<sub>2</sub>O e ácido fórmico a 0,1%, e fase B, com acetonitrilo e ácido fórmico a 0,1%. Para a separação do peptídeo, foi utilizado um gradiente linear de acetonitrila a 5-95%. Finalmente, os peptídeos eluídos foram diretamente introduzidos a um Espectrómetro de Massa Micromass Q-TOF *Micro System* (Waters, Manchester, Reino Unido) por meio da sua sonda de membrana *electrospray*. Os íons mais abundantes observados no espectro de MS foram automaticamente selecionados para dissociação induzida por colisão, usando o *software Masslynx*, gerando espectros MS/MS. Argônio gasoso foi utilizado para o péptido de colisão de dissociação induzida. Os espectros resultantes foram processados pelo algoritmo *MaxEnt3* de *software Masslynx ProteinLynx* que gerou uma lista de massas que correspondem aos picos dos espectros obtidos na análise.

Para a comparação com o banco do NCBI, foi utilizada a ferramenta *MASCOT MS/MS Ion Search* ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), a qual foi configurada da seguinte maneira: digestão tríptica, com 1 sítio de clivagem perdida, carbomimetilação de cisteínas (Cys) como modificação fixa e oxidação de metionina (Met) como modificação variável, erro tolerante de 30 µg g<sup>-1</sup> e tolerância para erro de massa igual a 0,3 Da e para erro dos íons fragmentados de 0,1 Da. De acordo com a probabilidade de análise do MASCOT apenas os “hits” significativos (p<0,05) foram aceitos. Foi realizado também a comparação no banco de dados do *ProteinLynx Global Server 4.2* (WATERS), o qual foi configurado com os mesmos parâmetros utilizados na configuração do *MASCOT MS/MS Ion Search*. Após a proteína ter sido identificada, sua ontologia e função biológica foram verificadas no *Uniprot* ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) e *BLAST2Go* ([www.blast2go.com](http://www.blast2go.com)).

### 3.3 **Western blot**

As amostras, aproximadamente de 10 µg cada, juntamente com 5µL de marcador de peso molecular (*Kaleidoscope*, pré-corado, *Bio-Rad*, EUA) foram então carregadas em géis de poliacrilamida a 12% contendo SDS, que foi



submetido à corrida em amperagem constante de 60 mA até que as amostras alcançassem o final do gel. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (*BioRad*), utilizando tampão de transferência gelado contendo trisma ( $25 \text{ mmolL}^{-1}$ ), glicina ( $0,2 \text{ molL}^{-1}$ ) e metanol (10%) durante 1 h em amperagem constante de 250 mA. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com corante *Ponceau* por 5 min para verificação da transferência. O corante foi então retirado e a membrana foi submetida à lavagem com TBS (Tris a  $0,02 \text{ M}$ , NaCl a  $0,15 \text{ M}$ , pH 7,4) por 5 min e, em seguida, foi então incubada com solução de bloqueio dos sítios não ocupados durante 30 min à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi constituída a base de leite (10%) em TBS-T (tampão trisma-salina com *tween* 20 a 0,05%). Após este bloqueio, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: Catalase (Anti-CAT) e Subunidade  $\beta$ -ATP sintase (Anti-ATP sintase beta) durante 1 h, em agitação constante. Em seguida, a membrana foi submetida à lavagem com TBS (Tris a  $0,02 \text{ M}$ , NaCl a  $0,15 \text{ M}$ , pH 7,4) por 15 min. Logo após, o anticorpo secundário foi conjugado a uma fosfatase alcalina (Anti-IgG de coelho), cuja incubação da membrana com este anticorpo foi feita em temperatura ambiente durante 1 h. Após incubação, a membrana foi novamente lavada, como descrito anteriormente, e incubada em 10 mL de solução contendo 1 mL de tampão de substrato 10X (Tris 12,11 g, NaCl 5,84 g,  $\text{MgCl}_2$  1,02 g,  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 80 mL, pH 9,5), 9 mL de água destilada deionizada, 25  $\mu\text{L}$  de BCIP e 50  $\mu\text{L}$  de NBT, na ausência de luz até o aparecimento da reação. Após revelação, o acúmulo relativo foi determinado a partir das imagens da membrana de nitrocelulose, utilizando o programa *Gel Quant Net 8.0*.

### 3.4 Rede de interação

As redes foram construídas usando o software STRING 10 (<http://www.string-db.org>) de acordo com os seguintes parâmetros: uso da co-expressão, experimentos e bancos de dados de coocorrência; não mais do que 50 interações; e valor de confiança de 0,7 e como organismo modelo a espécie *Arabidopsis thaliana*. As proteínas que não apresentaram qualquer conexão com a rede geral foram submetidas novamente ao software STRING; tal

processo foi repetido até que não foram encontradas mais conexões. Os sub-gráficos gerados foram associados usando o Cytoscape 3.2.1 (<http://www.cytoscape.org>) (SHANNON et al., 2003) com o uso da ferramenta de redes de mesclagem, para gerar as redes finais.

A análise de agrupamento de ontologias de genes foi realizada utilizando o software Biological Network Gene Ontology (BiNGO) v.2.44, um plugin Cytoscape disponível em <http://www.cytoscape.org> (MAERE et al., 2005). O grau de enriquecimento funcional para um determinado cluster e categoria foi avaliado quantitativamente (valor p) por distribuição hipergeométrica e uma correção de múltiplos testes foi aplicada usando o algoritmo de taxa de descoberta falsa (FDR), totalmente implementado no software (MAERE et al., 2005). Categorias de processos biológicos super-representados foram gerados após a correção do FDR, com nível de significância de 0,05.

### 3.5 **Análise estatística**

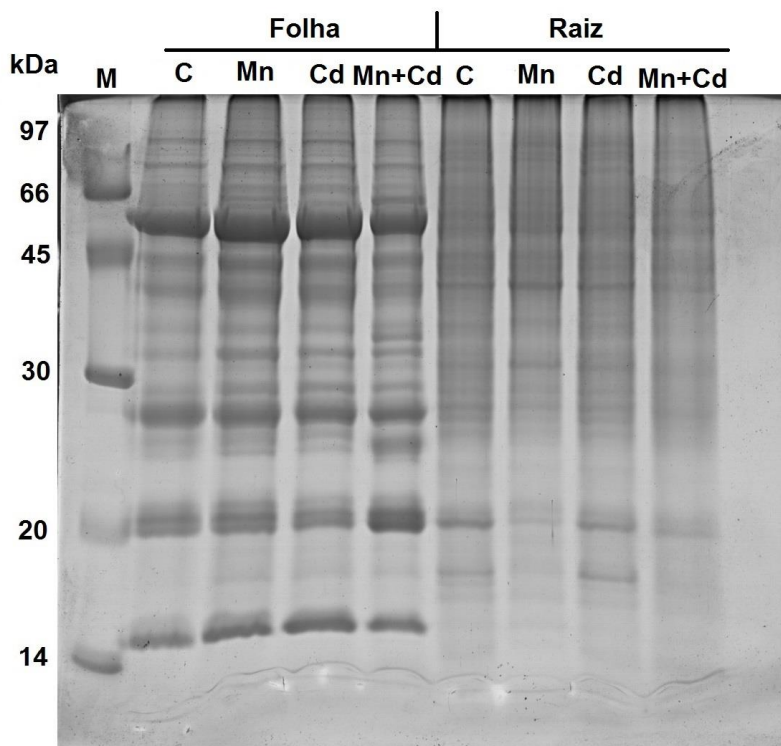
O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos (doses de Cd, Mn, Cd+Mn e controle) e 10 repetições por tratamento, com uma planta por unidade experimental. Os dados foram submetidos a ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Perfil proteico de amostras foliares e radiculares obtidos por meio de SDS-PAGE e 2D-PAGE

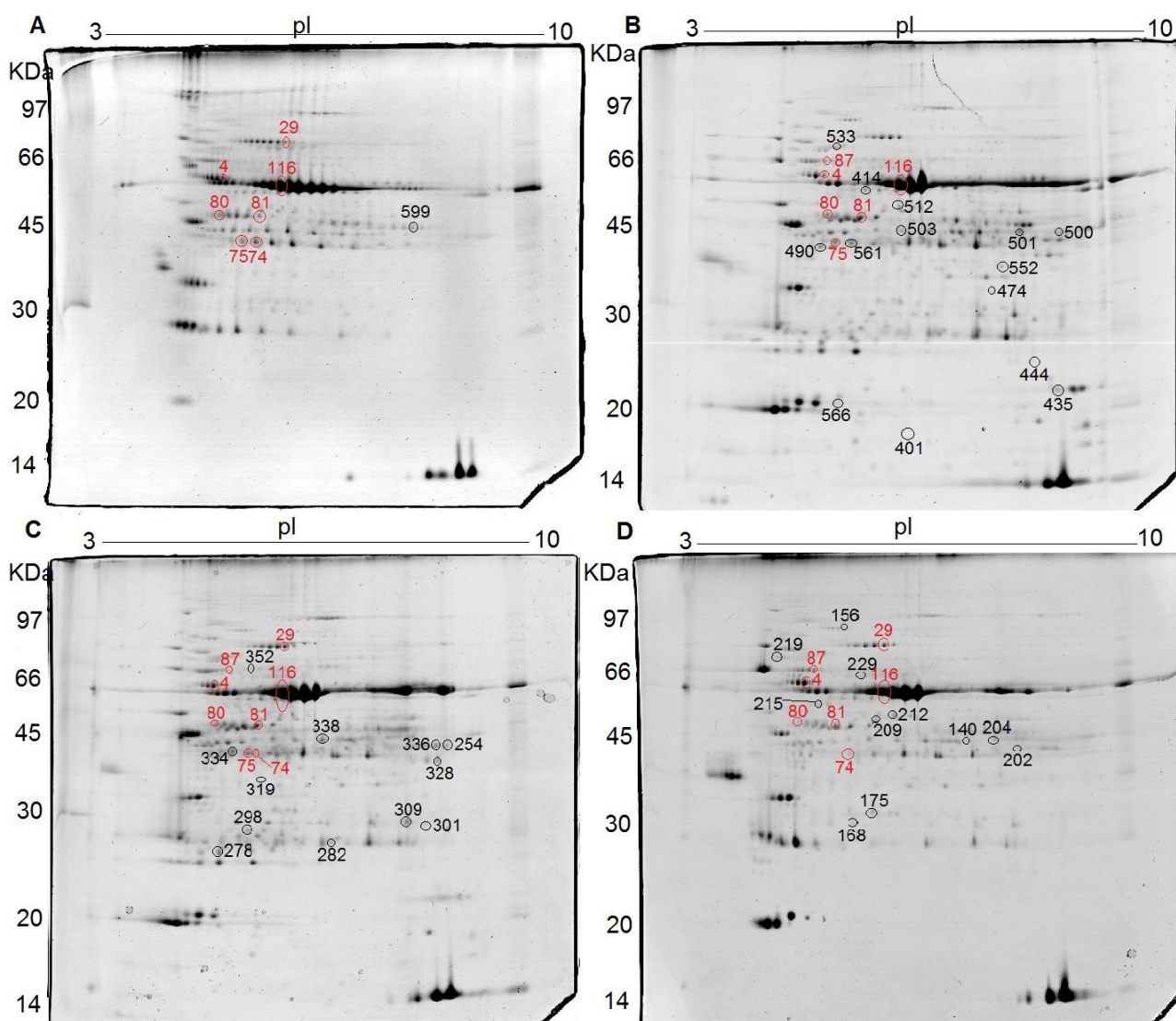
O perfil proteico em SDS-PAGE a 12,5% (Figura 1) mostra bandas com massas moleculares distribuídas nas faixas entre 14 e ~110 kDa, com bandas bem definidas nas amostras foliares em torno de 14, 20, 30 e entre 45 e 66 kDa. Nas amostras radiculares tem bandas bem definidas em torno de 20 e um pouco abaixo de 45 kDa.

As amostras foliares e radiculares apresentaram uma distribuição de proteínas em todo o gel, o que evidencia uma variedade de proteínas extraídas. No entanto, nas amostras radiculares não houve uma grande quantidade de bandas definidas como nas amostras foliares. Após a verificação da quantificação, procedeu-se a confecção do gel 2D-PAGE (Figura 1).

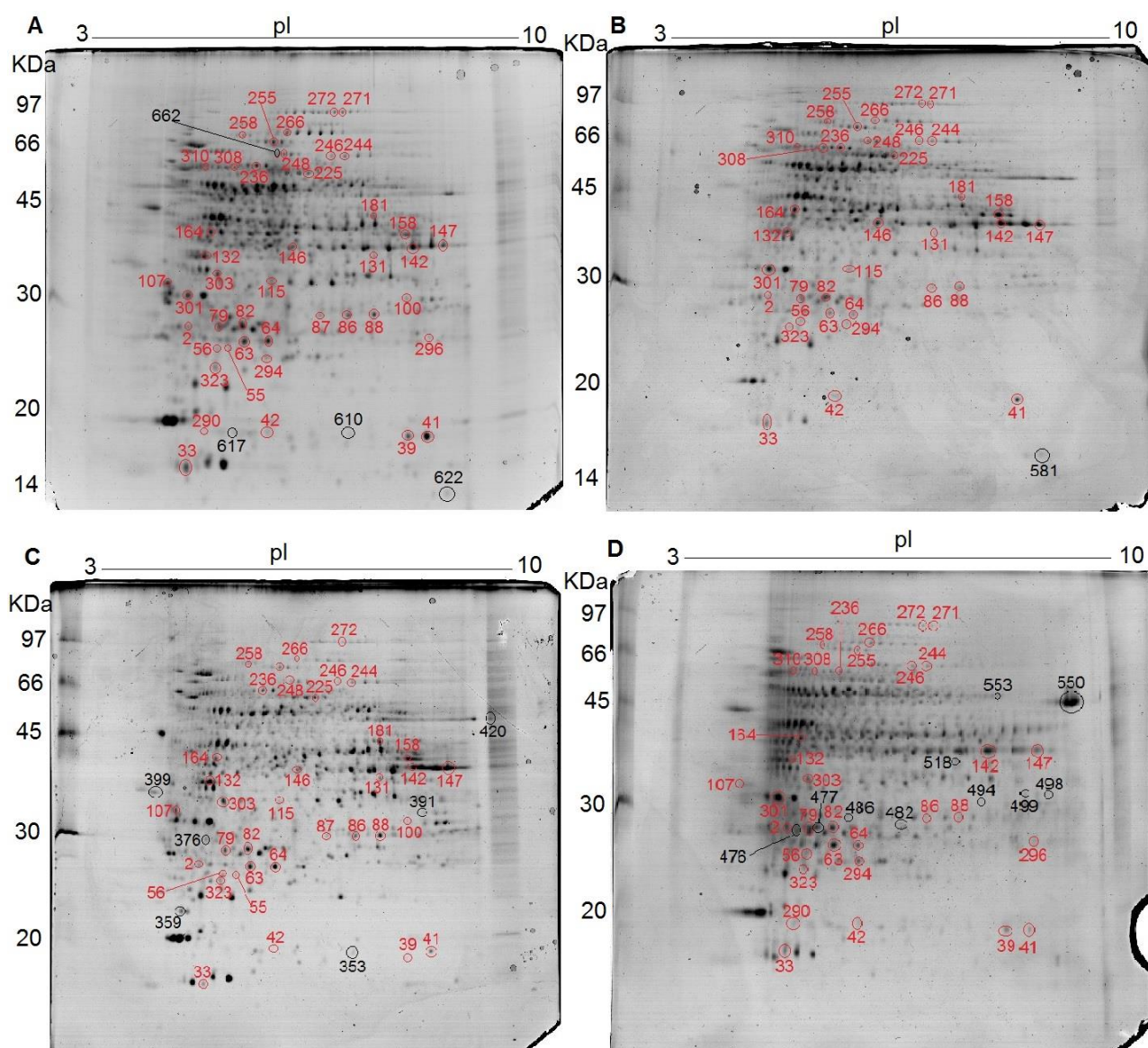


**Figura 1** – Perfil proteico das amostras foliares e radiculares em SDS-PAGE de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos de Cd, Mn e Cd+Mn no solo. **M** – marcador molecular; **C** – controle: sem adição de Mn e Cd no solo; **Mn** – (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo); **Cd** – (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e Cd+Mn – (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo). kDa corresponde à massa molecular.

O perfil dos *spots* de proteínas das amostras foliares e radiculares de cacau submetidos aos tratamentos: C; Mn; Cd e Cd+Mn foram visualizados por meio de revelação dos géis - 2D (Figuras 2 e 3). A partir da análise no *ImageMaster 2D 7.0 platinum* (GE Healthcare) foi possível identificar o perfil protéico de *spots*. Assim, foram identificados 609 *spots* em folhas e 663 *spots* em raízes, sendo que destes 514 *spots* foram estatisticamente significativos em folhas ( $p < 0,05$ ) e 523 em raízes ( $p < 0,05$ ).



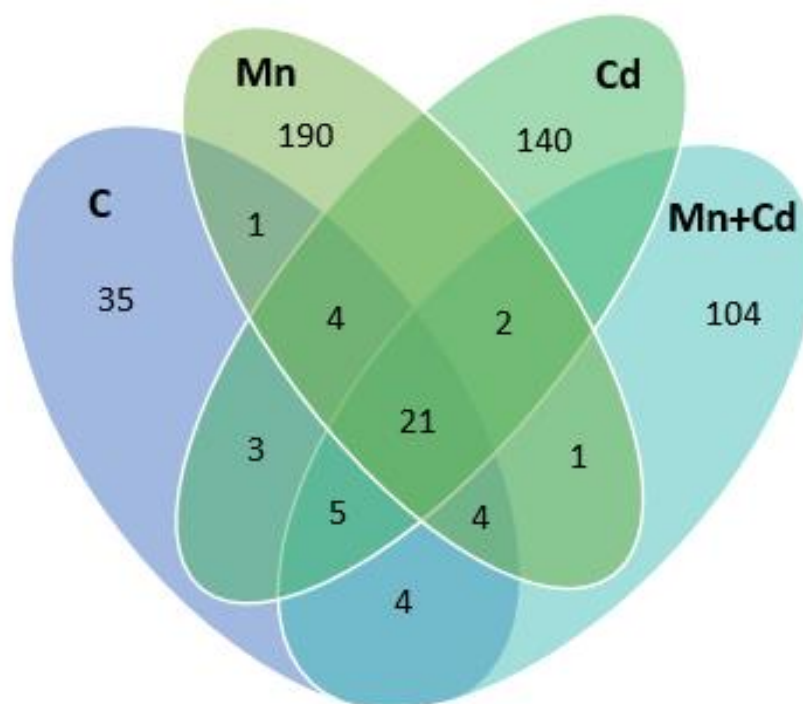
**Figura 2** – Perfil proteico das amostras foliares em gel 2D-PAGE de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos de Cd, Mn e Cd+Mn no solo. **A** - C (controle: sem adição de Mn e Cd no solo); **B** - Mn ( $1,6 \text{ mmol kg}^{-1}$  solo); **C** - Cd ( $0,8 \text{ mmol kg}^{-1}$  solo) e **D** – Cd+Mn ( $0,4 \text{ mmol Cd kg}^{-1}$  solo +  $0,8 \text{ mmol Mn kg}^{-1}$  solo), com marcação dos *spots*. *Spots* vermelhos: diferencialmente acumulados, *spots* pretos: exclusivos. kDa corresponde à massa molecular e pI o ponto isoelétrico de cada *spot*, variando de 3-10 NL (não linear).



**Figura 3** – Perfil proteico das amostras radiculares em gel 2D-PAGE de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos de Cd, Mn e Cd+Mn no solo. **A** - C (controle: sem adição de Mn e Cd no solo); **B** - Mn ( $1,6 \text{ mmol kg}^{-1}$  solo); **C** - Cd ( $0,8 \text{ mmol kg}^{-1}$  solo) e **D** – Cd+Mn ( $0,4 \text{ mmol Cd kg}^{-1}$  solo +  $0,8 \text{ mmol Mn kg}^{-1}$  solo), com marcação dos *spots*. *Spots* vermelhos: diferencialmente acumulados, *spots* pretos: exclusivos. kDa corresponde à massa molecular e pI o ponto isoelétrico de cada *spot*, variando de 3-10 NL (não linear).

Após a detecção dos *spots* totais nas amostras foliares e radiculares, foi realizada a comparação entre os tratamentos, onde foram detectados 130 *spots* comuns, sendo que destes 45 *spots* foram diferencialmente acumulados ( $p < 0,05$  e  $\text{fold} \geq 1,5$ ) e 469 exclusivos ( $p < 0,05$ ) em folhas, e 343 *spots* comuns, sendo que destes 206 *spots* foram diferencialmente acumulados ( $p < 0,05$  e  $\text{fold} \geq 1,5$ ) e 317 exclusivos ( $p < 0,05$ ) em raízes.

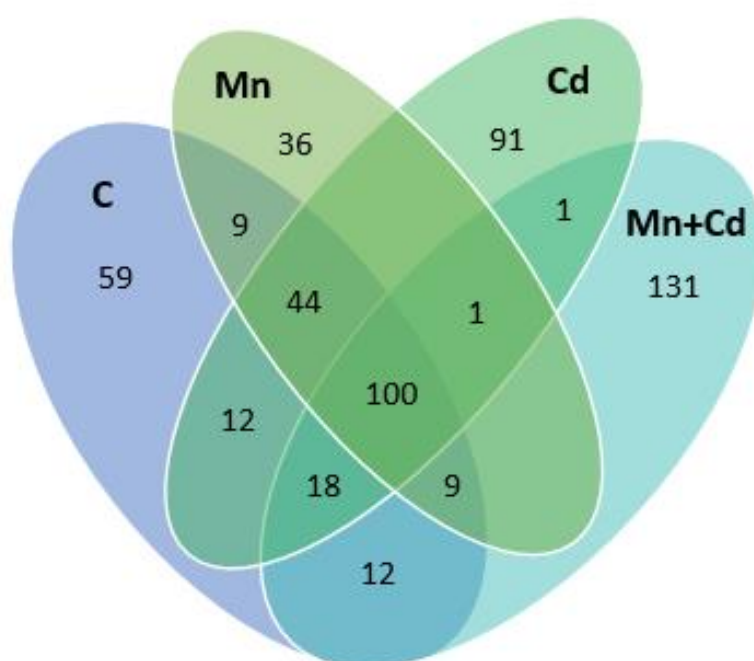
Dos 45 *spots* diferencialmente acumulados em folhas, 21 destes ocorreram nos 4 tratamentos [controle (C), Mn, Cd e Cd+Mn], 4 *spots* ocorreram em 3 tratamentos [controle (C), Mn e Cd], 4 *spots* ocorreram em 3 tratamentos [controle (C), Mn e Mn+Cd], 5 *spots* ocorreram em 3 tratamentos [controle (C), Cd e Mn+Cd], 2 *spots* ocorreram em 3 tratamentos (Mn, Cd e Mn+Cd), 1 *spot* ocorreu em 2 tratamentos [controle (C) e Mn], 3 *spots* ocorreram em 2 tratamentos [controle (C) e Cd], 2 *spots* ocorreram em 2 tratamentos [controle (C) e Mn+Cd] e 1 *spot* ocorreu em 2 tratamentos (Mn e Mn+Cd) (Figura 3). Dos 469 *spots* exclusivos, 35 *spots* foram exclusivos do tratamento controle (C), 190 *spots* foram exclusivos do tratamento com Mn, 140 *spots* foram exclusivos do tratamento com Cd e 104 *spots* foram exclusivos do tratamento com Mn+Cd (Figura 4).



**Figura 4** – Diagrama de Venn, mostrando a distribuição dos *spots* de amostras foliares detectados em gel 2D-PAGE de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos controle (sem adição de Mn e Cd no solo), Cd (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo), Mn (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e Cd+Mn (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo) no solo.

Dos 206 *spots* diferencialmente acumulados em raízes, 100 destes ocorreram nos 4 tratamentos [controle (C), Mn, Cd e Mn+Cd], 44 *spots* ocorreram em 3 tratamentos [controle (C), Mn e Cd], 9 *spots* ocorreram em 3

tratamentos [controle (C), Mn e Mn+Cd], 18 *spots* ocorreram em 3 tratamentos [controle (C), Cd e Mn+Cd], 1 *spot* ocorreu em 3 tratamentos (Mn, Cd e Mn+Cd), 9 *spots* ocorreram em 2 tratamentos [controle (C) e Mn], 12 *spots* ocorreram em 2 tratamentos [controle (C) e Cd], 12 *spots* ocorreram em 2 tratamentos [controle (C) e Mn+Cd] e 1 *spot* ocorreu em 2 tratamentos (Cd e Mn+Cd) (Figura 5). Dos 317 *spots* exclusivos, 59 *spots* foram exclusivos do tratamento controle (C), 36 *spots* foram exclusivos do tratamento com Mn, 91 *spots* foram exclusivos do tratamento com Cd e 131 *spots* foram exclusivos do tratamento com Mn+Cd (Figura 5).

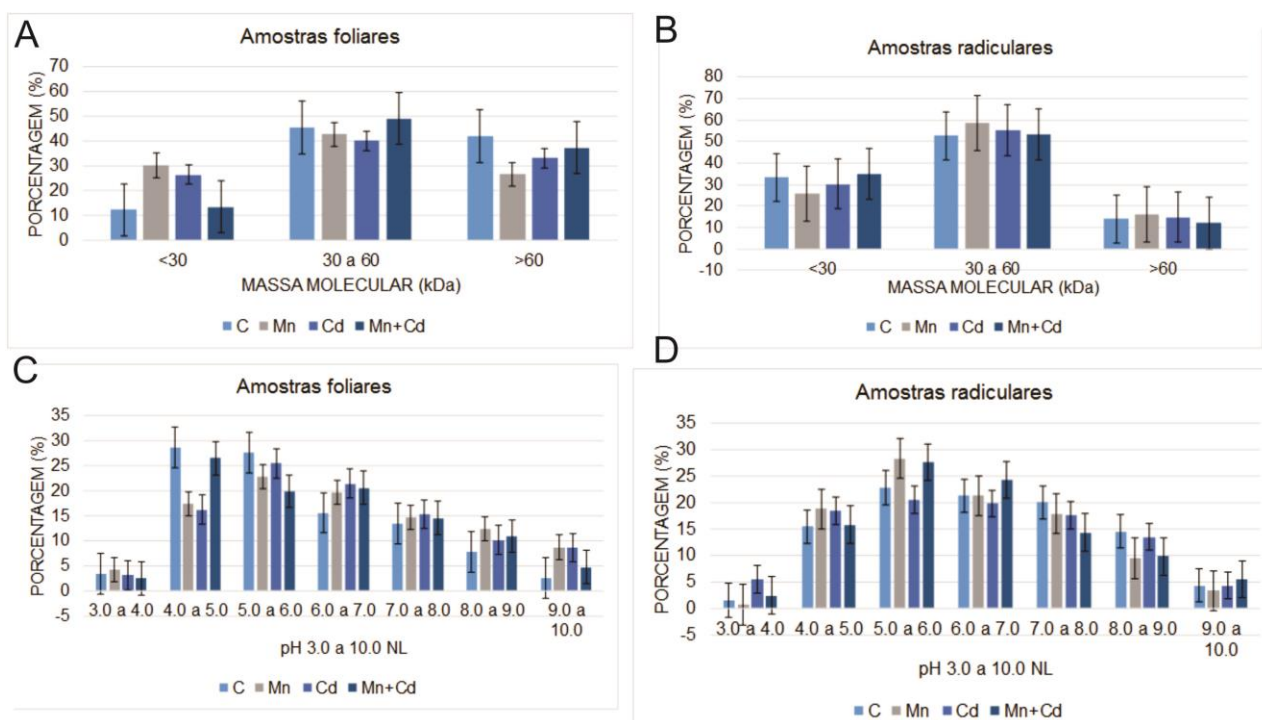


**Figura 5** – Diagrama de Venn, mostrando a distribuição dos *spots* de amostras radiculares detectados em gel 2D-PAGE de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos controle (sem adição de Mn e Cd no solo), Cd (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo), Mn (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e Cd+Mn (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo) no solo.

#### 4.2 Avaliação da distribuição de *spots* no gel 2-D quanto a massa molecular (MM) e o ponto isoelétrico (pI)

A avaliação da distribuição dos *spots* em relação à MM e pI foi realizada em todos os tratamentos das amostras foliares e radiculares de cacau. Em relação a MM, a maioria dos *spots* detectados nos géis foram visualizados na faixa de 30 a 60 kDa, tanto para amostras foliares quanto radiculares (Figura 6

A e B). Pôde-se observar que não houve variações significativas entre os tratamentos, mostrando que os tratamentos não afetaram a massa das proteínas.



**Figura 6** – Distribuição dos *spots* proteicos de amostras foliares e radiculares detectados em gel 2D-PAGE, de acordo com a massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI), de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos C (controle: sem adição de Mn e Cd no solo), Cd ( $0,8 \text{ mmol kg}^{-1}$  solo), Mn ( $1,6 \text{ mmol kg}^{-1}$  solo) e Cd+Mn no solo ( $0,4 \text{ mmol Cd kg}^{-1}$  solo +  $0,8 \text{ mmol Mn kg}^{-1}$  solo). **A** – Massa molecular das amostras foliares; **B** – Massa molecular das amostras radiculares; **C** – Ponto isoelétrico das amostras foliares e **D** – Ponto isoelétrico das amostras radiculares.

Com relação ao ponto isoelétrico (pI), a maioria dos *spots* foram visualizados na faixa de 4 a 7, tanto nas amostras foliares quanto radiculares (Figuras 6 C e D), onde também foi encontrada a mesma faixa de pH no trabalho de Carneiro et al. (2017). Nas amostras foliares, houve uma maior quantidade de proteínas em pH variando de 4 a 5, tanto no tratamento controle quanto no tratamento com Mn+Cd, enquanto que nos tratamentos com Mn e Cd houve uma maior quantidade de proteínas em pH variando de 5 a 6. Já nas amostras radiculares, houve uma maior quantidade de proteínas em pH variando de 5 a 6 nos tratamentos com Mn e Mn+Cd. Isso mostra que os tratamentos influenciaram na variação de pH das proteínas.



### 4.3 Identificação de proteínas

Os géis 2D-PAGE de cada tratamento foram analisados utilizando-se o *Image Master 7.0*. Após a análise das triplicatas dos géis de cada tratamento de amostras foliares e radiculares, estas foram comparadas com o objetivo de identificar os *spots* exclusivos e os diferencialmente acumulados em cada tratamento.

Os *spots* analisados foram identificados por espectrometria de massas (MS/MS) e categorizados de acordo com suas funções, envolvimento em processos biológicos e a qual componente celular pertence, 8 *spots* diferencialmente acumulados e 38 exclusivos nas amostras foliares (Tabela 1) e 42 *spots* diferencialmente acumulados e 21 exclusivos nas amostras radiculares (Tabela 2). Todos os *spots* que foram identificados por MS/MS estão marcados de acordo com seu tratamento (Figuras 2 e 3).

**Tabela 1** – Proteínas identificadas de amostras foliares de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos controle (sem adição de Mn e Cd no solo), Cd (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo), Mn (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e Cd+Mn (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo) no solo, por meio de espectrometria de massas (MS/MS).

N° SPOT	N° ACESSO	PROTEÍNA	MM	pl	N	SCOR	FOLD	C.C.	TRAT.
<b>PROCESSOS FOTOSSINTÉTICOS</b>									
4	EOY34440.1	<i>RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha isoform 1</i>	64075	5.06	23	1345	5.0501 5	Chlo	C; Mn↓; Cd↓; Mn+Cd↓
75	XP_007026083 .1	<i>PREDICTED: ATP synthase gamma chain, chloroplastic</i>	41685	5.57	14	708	2.5820 1	Chlo	C; Mn↓; Cd↑
80	ATPB_ACRAL	<i>ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS</i>	53809	5.29	8	145	3.7549 7	Chlo	C; Mn↓; Cd↓; Mn+Cd↓
81	RCA_ARATH	<i>Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase</i>	52347	5.87	23	123	2.7539 1	Chlo	C; Mn↑; Cd↑; Mn+Cd↑
168	EOY16965.1	<i>Light harvesting complex of photosystem II 5 isoform 1</i>	31139	5.74	7	543	∞	Chlo	Mn+Cd↑
215	ATPA_AMBTC	<i>ATP synthase subunit alpha, chloroplastic OS</i>	55387	5.25	3	118	∞	Chlo	Mn+Cd↑
229	ATPB_EUCGG	<i>ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS</i>	53752	5.29	103	3202	∞	Chlo	Mn+Cd↑
301	RPE_ORYSJ	<i>Ribulose-phosphate 3-epimerase, chloroplastic OS</i>	29244	8.65	1	85	∞		Cd↑

338	AAM55983.1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial (chloroplast)	47796	6.97	3	195	∞	Chlo	Cd↑
352	EOY26303.1	Vacuolar ATP synthase subunit A isoform 1	73558	5.64	14	1060	∞	V	Cd↑
414	ATPBM_HEVB R	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS	60335	5.95	5	153	∞	Mito	Mn↑
435	XP_007033270 .1	PREDICTED: ribulose bisphosphate carboxylase small chain, chloroplastic	21174	9.22	10	349	∞	Chlo	Mn↑
503	RBL_ANEME	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (Fragment)	46840	6.57	1	53	∞	Chlo	Mn↑
512	RBL_SOLBU	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain OS	53397	6.55	21	406	∞	Chlo	Mn↑
533	FTSH2_ORYSJ	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH 2, chloroplastic OS	72607	5.54	28	555	∞	Chlo	Mn↑
561	XP_007026083 .1	PREDICTED: ATP synthase gamma chain, chloroplastic	41685	5.57	14	708	∞	Chlo	Mn↑

### PROTEÍNAS DE OXIDORREDUÇÃO

298	BAS1_ORYSJ	2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic OS	28311	5.67	8	183	∞	Chlo	Cd↑
328	EOX90844.1	Ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 2	41685	8.84	6	491	∞	Chlo	Cd↑
599	XP_017978306 .1	PREDICTED: ferredoxin—NADP reductase, leaf isozyme, chloroplastic	46018	9.02	5	303	0	Chlo	C

### RESPOSTAS DE DEFESA E ESTRESSE

87	<i>HSP7E_ARAT H</i>	<i>Heat shock 70 kDa protein 5 OS</i>	70870	5.3	2	84	1.5431 3	PC	Mn↑, Cd↑, Mn+Cd↑
116	<i>CH60B_ARAT H</i>	<i>Chaperonin CPN60-like 1, mitochondrial OS</i>	62339	6.37	3	52	2.8597 2	Mito	C; Mn↓; Cd↓; Mn+Cd↓
254	<i>KAX1D_LEIQH</i>	<i>Potassium channel toxin alpha-KTx 1.13 OS</i>	4657	9.08	2	107	∞	Ext	Cd↑
282	<i>XP_017977172 .1</i>	<i>PREDICTED: proteasome subunit beta type-4</i>	27716	7.03	7	323	∞	N	Cd↑
444	<i>XP_017973703 .1</i>	<i>PREDICTED: thylakoid lumenal 17.4 kDa protein, chloroplastic</i>	25977	8.72	2	212	∞	Chlo	Mn↑

## PROCESSOS METABÓLICOS

29	<i>EOX96247.1</i>	<i>Transketolase</i>	81006	6.34	18	967	2.6508 9	Chlo	C; Cd↑; Mn+Cd↑
74	<i>GME_ARATH</i>	<i>GDP-mannose 3,5-epimerase OS</i>	43130	5.85	7	157	3.2093 1	Cyt	C; Cd↑; Mn+Cd↓
140	<i>EOY32823.1</i>	<i>Alanine:glyoxylate aminotransferase isoform 1</i>	44620	7.62	4	275	∞		Mn+Cd↑
175	<i>AAG15839.2</i>	<i>ADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase</i>	35336	6.01	2	133	∞	Chlo	Mn+Cd↑
202	<i>EOX97859.1</i>	<i>Fructose-bisphosphate aldolase 1</i>	43279	8.43	8	695	∞	Chlo	Mn+Cd↑
204	<i>EOX90904.1</i>	<i>Fructose-bisphosphate aldolase 2 isoform 1</i>	43182	8.14	4	185	∞	MP	Mn+Cd↑
209	<i>GLGS_ARATH</i>	<i>Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small</i>	56957	6.13	6	210	∞	Chlo	Mn+Cd↑

212	GGT1_ARATH	Glutamate--glyoxylate aminotransferase 1 OS	53780	6.49	3	69	∞	V	Mn+Cd↑
219	ARGI1_ARATH	Arginase 1, mitochondrial OS	37549	6.11	8	146	∞	Mito	Mn+Cd↑
319	EOX97285.1	Malate dehydrogenase isoform 1	41725	9.00	11	447	∞	Mito	Cd↑
334	ADV04491.1	Beta-actin	41924	5.39	7	429	∞		Cd↑
336	XP_007026120.1	Predicted: aminomethyltransferase, mitochondrial	44708	8.86	2	130	∞	Mito	Cd↑
401	XP_008787626.1	PREDICTED: low quality protein: DNA ligase 6-like	158222	6.94	1	58	∞	N	Mn↑
474	EOY18135.1	Triosephosphate isomerase isoform 1	32446	8.05	8	490	∞	Cyt	Mn↑
552	EOY02403.1	Carbonic anhydrase 1 isoform 2	35284	8.35	11	600	∞	Chlo	Mn↑

## OUTRAS FUNÇÕES

156	MUTS2_LEUC K	Endonuclease MutS2 OS	87706	5.68	3	42	∞		Mn+Cd↑
278	EOX98378.1	Plant basic secretory protein (BSP) family protein, putative	26308	5.17	4	271	∞		Cd↑
309	EOY03376.1	Voltage dependent anion channel 1	29642	8.39	8	648	∞		Cd↑
490	EOY15776.1	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	44453	5.10	3	185	∞		Mn↑
500	KVI00009.1	Hypothetical protein Ccrd_021776	48291	9.20	1	53	∞		Mn↑

501	<i>KQL02397.1</i>	<i>Hypothetical protein SETIT_013768mg</i>	47980	8.43	2	124	∞	Mn↑
566	<i>RRF_SACD2</i>	<i>Ribosome-recycling factor OS=Saccharophagus degradans</i>	20655	5.59	13	54	∞	Mn↑

MM corresponde a massa molecular;

pl corresponde ao ponto isoelétrico;

N corresponde ao número de peptídeos lido pelo MS/MS;

Scor corresponde ao valor da cobertura calculado pelo Mascot;

Fold corresponde a comparação do nível de acúmulo da proteína entre o 2D-PAGE dos tratamentos. Fold>1,5 e p<0,05;

C. C. corresponde ao componente celular pertencente à proteína; chlo – cloroplasto; mito – mitocôndria; mp – membrana plasmática; n – núcleo; cyt – citoplasma; ext – espaço extracelular; v – vacúolo; pc – parede celular;

Trat. corresponde aos tratamentos utilizados neste trabalho;

∞ Proteínas exclusivas;

↑ Proteínas “up-regulation” no tratamento com relação ao controle;

↓ Proteínas “down-regulation” no tratamento com relação ao controle.

**Tabela 2** – Proteínas identificadas de amostras radiculares de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos controle (sem adição de Mn e Cd no solo), Cd (0,8 mmol kg<sup>-1</sup> solo), Mn (1,6 mmol kg<sup>-1</sup> solo) e Cd+Mn (0,4 mmol Cd kg<sup>-1</sup> solo + 0,8 mmol Mn kg<sup>-1</sup> solo) no solo, por meio de espectrometria de massas (MS/MS).

Nº SPOT	Nº ACESSO	PROTEÍNA	MM	pl	N	SCOR	FOLD	C.C.	TRAT.
<b>PROCESSOS FOTOSSINTÉTICOS</b>									
55	XP_015880818 .1	PREDICTED: chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic	29902	6.85	2	154	1.9414 4	Chlo	C; Cd↓
246	XP_004969796 .1	NADP-dependent malic enzyme isoform X1	65866	5.65	2	135	2.5771 6		C; Mn↓; Cd↓; Mn+Cd↓
248	XP_007046957 .1	PREDICTED: succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit 1, mitochondrial	70449	6.19	4	315	1.6306 4	Mito	C; Mn↓; Cd↓
310*	ATPA_AMBTC	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic OS	55386	5.25	2	96	2.059 45	Chlo	C; Mn↓; Mn+Cd↓
622*	RBS_FAGCR	Ribulose biphosphate carboxylase small chain, chloroplastic OS	20549	9.19	2	55	0	Chlo	C
<b>PROTEÍNAS DE OXIDORREDUÇÃO</b>									
115	EOY14797.1	Isoflavone reductase-like protein 4 isoform 1	34864	6.16	4	294	1.657 75	Cy t	C; Mn↓; Cd↑
142	EOY02670.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2 isoform 2	36856	8.51	19	504	1.780 16	Cy t	C; Mn↓; Cd↓;

181	EOY16613.1	Alcohol dehydrogenase 1 isoform 1	42553	6.56	4	326	2.660 12		Mn+Cd↓ C; Mn↓; Cd↓
236	XP_0124361 57.1	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 1, chloroplastic-like	61049	8.70	3	198	3.287 17	Mit o	C; Mn↓; Cd↓; Mn+Cd↓
272	EOY01474.1	Aconitase 3	10926 6	8.25	2	111	1.836 3	Cy t	C; Mn↑; Cd↑; Mn+Cd↓
308	PSS02684.1	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	63342	6.32	2	152	2.820 72	Mit o	C; Mn↑; Mn+Cd↑
518	XP_0156468 44.1	ferredoxin--NADP reductase, embryo isozyme, chloroplastic	21390	9.01	2	63	∞	Ch lo	Mn+Cd↑

## RESPOSTAS DE DEFESA E ESTRESSE

2	PSA2A_ARAT H	Proteasome subunit alpha type-2-A OS	25685	5.53	2	68	2.4668 8	N	C; Mn↓; Cd↑; Mn+Cd↓
33	C0HK70.1	RecName: Full=Superoxide dismutase [Cu- Zn]	15232	5.48	1	60	2.4922	N	C; Mn↓; Cd↓; Mn+Cd↓
56	EOY30200.1	Chaperonin 20 isoform 2	26752	8.55	2	133	2.0959	Chlo	C; Mn↑; Cd↓; Mn+Cd↑
87	NP_001314131 .1	S-formylglutathione hydrolase	32201	6.82	1	61	1.8224 3		C; Cd↓



132	APV45523.1	3-phosphoglycerate kinase, partial	42353	5.97	4	282	2.6831	Cyt	C; Mn↓; Cd↓; Mn+Cd↓
164	EOY14104.1	Phosphoglycerate kinase isoform 1	42379	5.89	3	181	2.5268 3	Cyt	C; Mn↑; Cd↑; Mn+Cd↑
294	XP_002320726 .2	proteasome subunit beta type-1 isoform X1	14151	8.80	1	59	2.269 03	N	C; Mn↑; Mn+Cd↑
323	AAQ13823.1	osmotin-like pathogenesis-related protein, partial	26943	7.85	1	79	3.589 97		C; Mn↓; Cd↓; Mn+Cd↑
391	XP_007043003 .2	peroxidase N1	35992	7.55	1	59	∞	Ext	Cd↑
399*	EF1A1_ARATH	Elongation factor 1-alpha 1 OS	49813	9.19	1	50	∞	Cyt	Cd↑
420	XP_017983624 .1	PREDICTED: peroxidase 15	37613	4.61	2	185	∞	Ext	Cd↑
476	EOY18399.1	Chalcone-flavanone isomerase family protein	33647	8.82	2	149	∞	N	Mn+Cd↑
498	EOX98837.1	Cationic peroxidase 2 precursor	55145	9.41	4	300	∞	Ext	Mn+Cd↑
499	XP_010905761 .2	PREDICTED: peroxidase 11	37071	4.85	1	107	∞	Ext	Mn+Cd↑
553	AIX10947.1	putative catalase	57463	6.94	3	193	∞	Mito	Mn+Cd↑

## PROCESSOS METABÓLICOS

63	EOY18135.1	<i>Triosephosphate isomerase isoform 1</i>	32446	8.05	3	196	1.5141 9	Cyt	C; Mn↑; Cd↓; Mn+Cd ↑
64	PIN05818.1	<i>20S proteasome, regulatory subunit alpha type PSMA3/PRE10</i>	27610	5.92	1	60	2.4796 2	N	C; Mn↓; Cd↓; Mn+Cd↓
79	XP_007024947 .1	<i>PREDICTED: proteasome subunit alpha type-2-A</i>	25699	5.51	5	287	2.3150 6	N	C; Mn↓; Cd↓; Mn+Cd↓
82	EOY34025.1	<i>Triosephosphate isomerase</i>	27497	5.54	4	229	1.5307 6	Cyt	C; Mn↑; Cd↓; Mn+Cd↓
100	KHN08385.1	<i>Proteasome subunit alpha type-7</i>	29576	6.46	2	141	1.5401 4	N	C; Cd↓
146	XP_006423478 .1	<i>fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic</i>	39465	9.07	2	133	2.3239 3	Chlo	C; Mn↓; Cd↓
147	NP_001314579 .1	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic</i>	37255	7.02	3	184	2.5351 2	Cyt	C; Mn↑; Cd↑; Mn+Cd↓
225	AIZ00507.1	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, partial</i>	21578	6.67	1	70	1.5261 4		C; Mn↑; Cd↑
244	PPE01465.1	<i>PREDICTED: pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha isoform X1</i>	63561	6.68	1	75	1.7675 7		C; Mn↑; Cd↑; Mn+Cd↓

266*	METE_CATRO	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-- homocysteine methyltransferase OS	85089	6.10	1	45	1.9412	Cyt	C; Mn↓; Cd↓; Mn+Cd↓
271*	ACOC_ORYSJ	Putative aconitate hydratase, cytoplasmic OS	98591	5.67	2	93	3.3128 7	Cyt	C; Mn↑; Mn+Cd↓
296	XP_017215013 .1	PREDICTED: proteasome subunit beta type-4-like isoform X1	32692	8.68	3	131	4.298 33	N	C; Mn↑
353	XP_008787626 .1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: DNA ligase 6-like	158222	6.94	1	54	∞		Cd↑
376	EOX97760.1	Triosephosphate isomerase isoform 1	43325	6.83	4	334	∞	Cyt	Cd↑
477	KHG06366.1	Proteasome subunit alpha type-2-B -like protein	11628	9.70	1	59	∞	N	Mn+Cd↑
486	PSA3_ARATH	Proteasome subunit alpha type-3 OS	27645	5.93	1	52	∞	N	Mn+Cd↑
494*	PSA7A_ARAT H	Proteasome subunit alpha type-7-A OS	27434	6.86	1	43	∞	N	Mn+Cd↑

### OUTRAS FUNÇÕES

39	AVV30151.1	Cyclophilin	18726	8.73	5	213	2.9490 1		C; Cd↓; Mn+Cd↓
41	XP_007041920 .1	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	18476	8.29	11	388	5.4206 8	Mito	C; Mn↓; Cd↓; Mn+Cd↓
42	EOY21247.1	21 kDa seed protein	24264	5.71	1	63	2.2416 4	M	C; Mn↓; Cd↓;

86	XP_007046221 .1	PREDICTED: mitochondrial outer membrane protein porin of 36 kDa	29839	6.59	3	179	1.858 27	Mito	Mn+Cd↓ C; Mn↓; Cd↓;
88	XP_021299693 .1	mitochondrial outer membrane protein porin of 36 kDa-like	29752	7.71	5	336	2.9428 4	Mito	Mn+Cd↓ C; Mn↑; Cd↑;
107	XP_007018723 .1	PREDICTED: 14-3-3-like protein	30354	4.75	3	174	2.0236 4	M	Mn+Cd↓ C; Cd↑; Mn+Cd↑
131	CDP01929.1	unnamed protein product	35264	8.76	1	59	1.969		C; Mn↓; Cd↓
158	EOY28328.1	Larreatricin hydroxylase isoform 1	67801	6.23	4	314	3.1970 8		C; Mn↑; Cd↑
255	EOY10525.1	Cobalamin-independent synthase family protein isoform 1	85035	6.15	5	322	1.9127 5		C; Mn↑; Cd↑; Mn+Cd↓
258	PKA66456.1	Putative E3 ubiquitin-protein ligase LIN-1	169475	5.71	1	58	3.0281 5		C; Mn↓; Cd↓; Mn+Cd↓
290	CAC84116.1	eptidylprolyl isomerase (cyclophilin)	18726	8.73	5	213	3.861 12		C; Mn+Cd↑
303	EOY20710.1	Carbonic anhydrase 2, CA2	29877	5.41	1	55	2.257 39		C; Cd↑; Mn+Cd↑
359	XP_007036743 .1	PREDICTED: 21 kDa seed protein	24423	5.70	9	526	∞	M	Cd↑

482	EOY02054.1	Mitochondrial outer membrane protein porin 1 isoform 2, partial	23941	6.10	2	114	∞	Mito	Mn+Cd↑
550	ABA12217.1	translation elongation factor 1A-1	49538	9.15	5	269	∞	Cyt	Mn+Cd↑
581	XP_017641637.1	60S ribosomal protein L14-1-like	18094	10.21	1	81	∞		Mn+Cd↑
610	EOY21251.1	21 kDa seed protein	24263	5.94	7	485	0	M	C
617	PKA61016.1	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	16641	5.43	2	120	0		C
662	XP_007046957.1	PREDICTED: succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit 1, mitochondrial	70449	6.19	4	315	0	Mito	C

\*Proteínas identificadas pelo banco de dados SwissProt;

MM corresponde a massa molecular;

pI corresponde ao ponto isoelétrico;

N corresponde ao número de peptídeos lido pelo MS/MS;

Scor corresponde ao valor da cobertura calculado pelo Mascot;

Fold corresponde a comparação do nível de acúmulo da proteína entre o 2D-PAGE dos tratamentos. Fold>1,5 e p<0,05;

C. C. corresponde ao componente celular pertencente à proteína; chlo – cloroplasto; mito – mitocôndria; m – membrana; n – núcleo; cyt – citoplasma; ext – espaço extracelular;

Trat. corresponde aos tratamentos utilizados neste trabalho;

∞ Proteínas exclusivas;

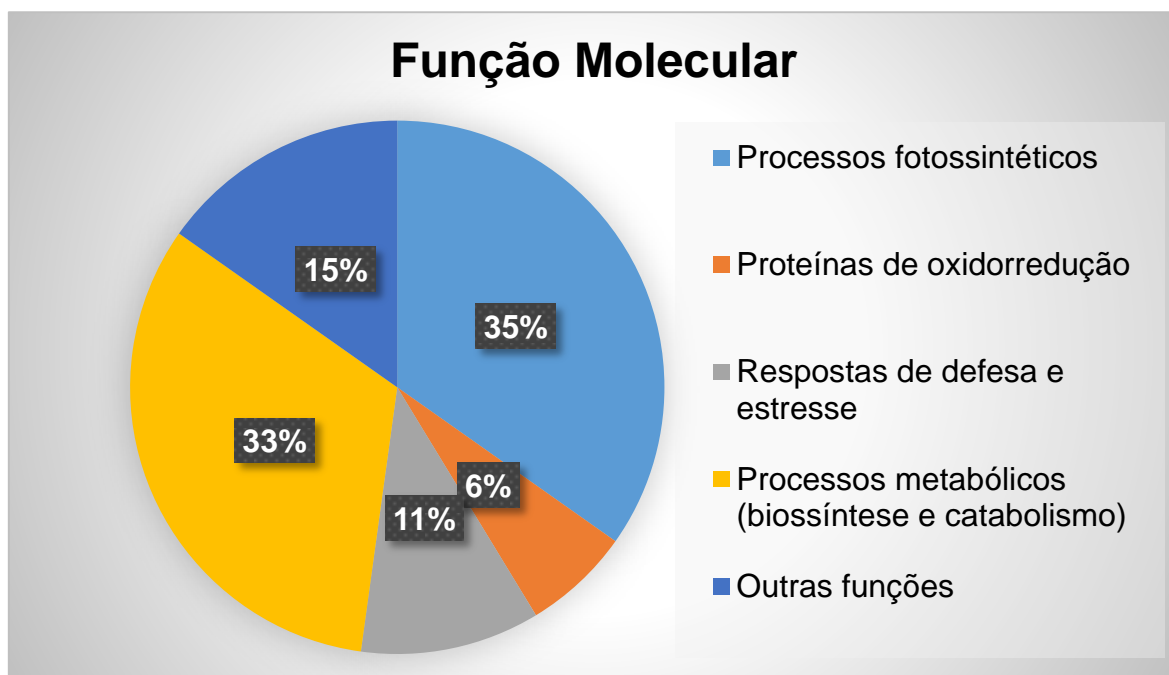
↑ Proteínas “up-regulation” no tratamento com relação ao controle;

↓ Proteínas “down-regulation” no tratamento com relação ao controle.

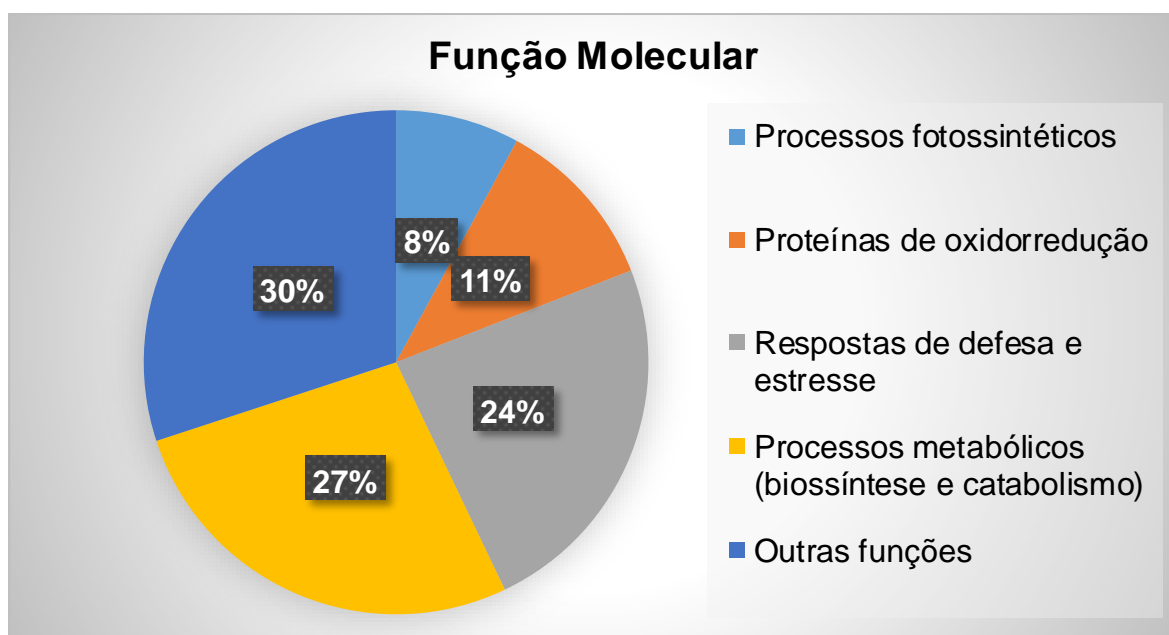
Após identificação das proteínas, foi feito um *Heat map* de expressão proteica de amostras foliares e radiculares baseado no perfil de acumulação e separadas por processos ao qual estão envolvidas (Figuras 9 e 10). A cor vermelha representa uma maior acumulação desta proteína na amostra e a cor branca representa que não houve acúmulo desta proteína na amostra (Figuras 9 e 10).

Por meio da classificação destas proteínas por processos biológicos, podemos observar qual tratamento está afetando estes processos. Nas amostras foliares, as proteínas envolvidas nos processos fotossintéticos foram mais acumuladas no tratamento com Mn. As proteínas envolvidas nos processos metabólicos foram mais acumuladas no tratamento com Mn+Cd. As proteínas envolvidas nos processos de oxidorredução foram mais acumuladas no tratamento com Cd e controle. As proteínas envolvidas em resposta a defesa e estresse foram mais acumuladas no tratamento com Cd e por fim as proteínas envolvidas em outras funções foram mais acumuladas no tratamento com Mn (Figura 9).

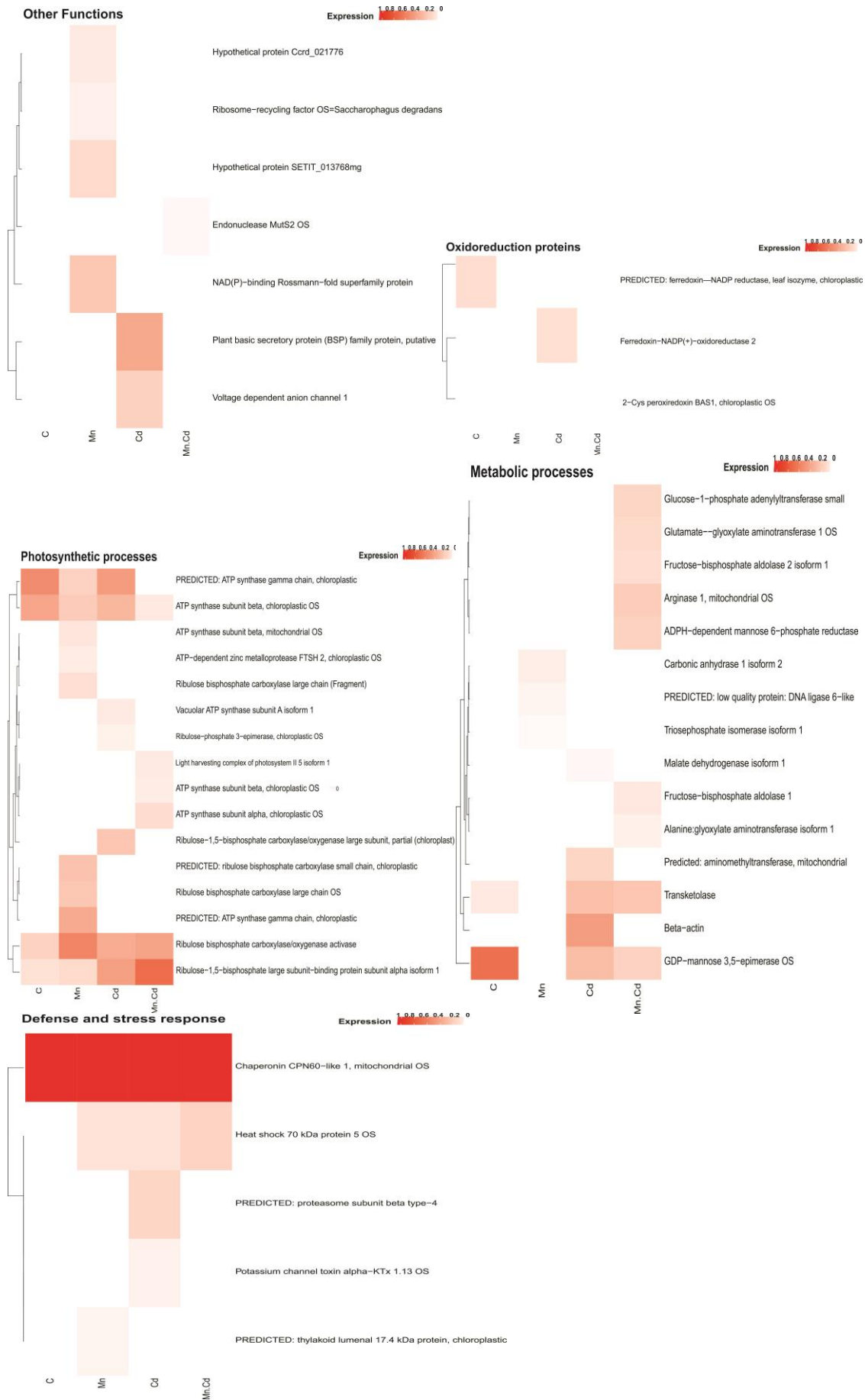
Nas amostras radiculares, as proteínas envolvidas em processos fotossintéticos foram mais acumuladas no tratamento controle. As proteínas envolvidas nos processos metabólicos foram mais acumuladas no tratamento com Cd. As proteínas envolvidas nos processos de oxidorredução foram mais acumuladas no tratamento controle e no tratamento com Mn. As proteínas envolvidas em resposta a defesa e estresse foram mais acumuladas no tratamento com Cd+Mn e por fim as proteínas envolvidas em outras funções foram mais acumuladas no tratamento controle (Figura 10).



**Figura 7** – Categorização funcional de proteínas diferencialmente acumuladas e exclusivas de amostras foliares de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos controle (sem adição de Mn e Cd no solo), Cd ( $0,8 \text{ mmol kg}^{-1}$  solo), Mn ( $1,6 \text{ mmol kg}^{-1}$  solo) e Cd+Mn ( $0,4 \text{ mmol Cd kg}^{-1}$  solo +  $0,8 \text{ mmol Mn kg}^{-1}$  solo) no solo.

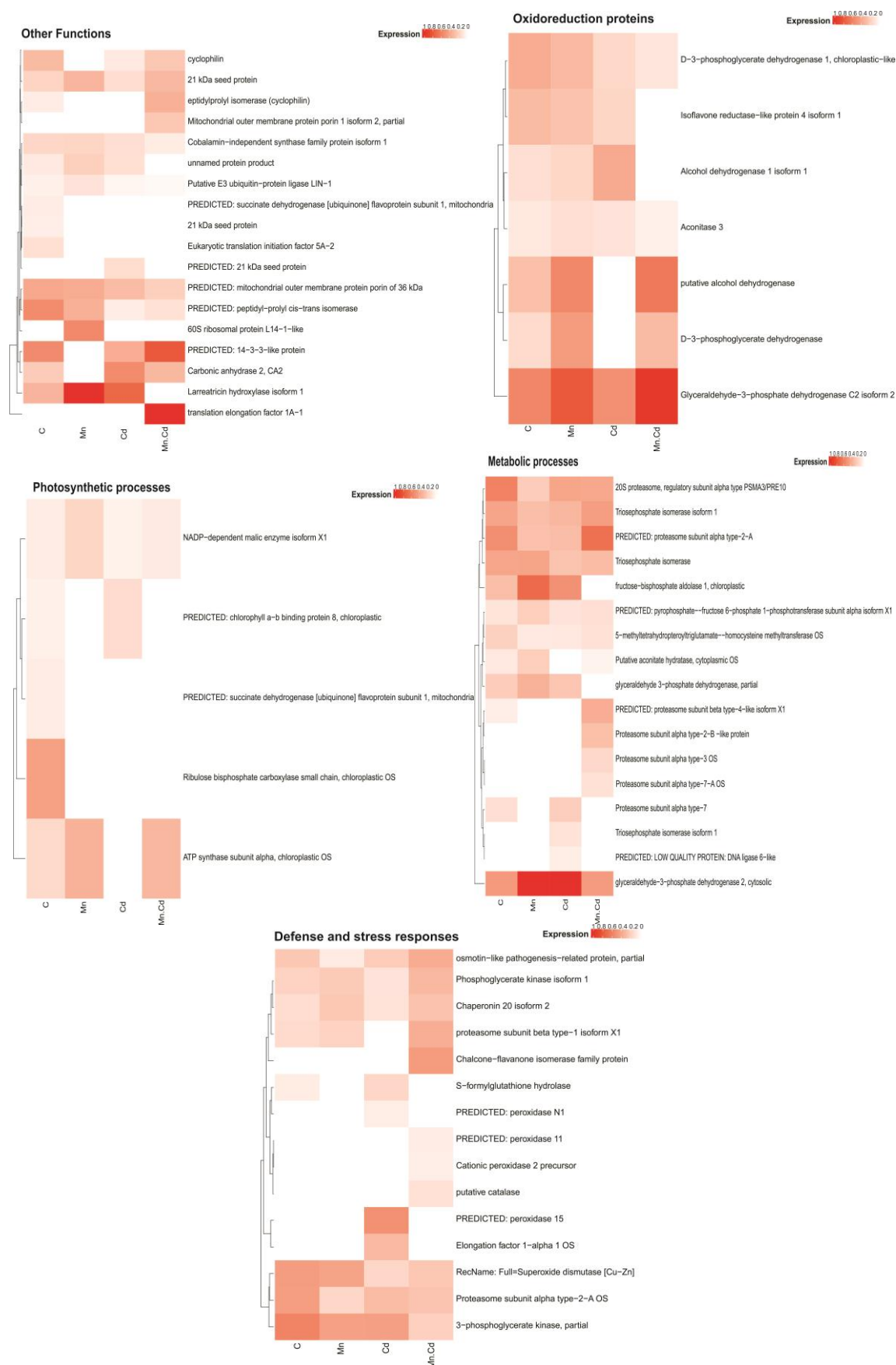


**Figura 8** – Categorização funcional de proteínas diferencialmente acumuladas e exclusivas de amostras radiculares de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos controle (sem adição de Mn e Cd no solo), Cd ( $0,8 \text{ mmol kg}^{-1}$  solo), Mn ( $1,6 \text{ mmol kg}^{-1}$  solo) e Cd+Mn ( $0,4 \text{ mmol Cd kg}^{-1}$  solo +  $0,8 \text{ mmol Mn kg}^{-1}$  solo) no solo.





**Figura 9** – Heat map de expressão de proteínas identificadas de amostras foliares baseada no perfil de acumulação.



**Figura 10** – *Heat map* de expressão de proteínas identificadas de amostras radiculares baseada no perfil de acumulação.

#### 4.4 Classificação funcional de proteínas de amostras foliares e radiculares

As proteínas identificadas foram classificadas funcionalmente e categorizadas em cinco grupos de acordo com suas funções e seu envolvimento em processos biológicos, utilizando a análise do *Gene Ontology* pelo software *Blast2GO*. Nas amostras foliares, a maioria das proteínas diferencialmente acumuladas e exclusivas está relacionada aos processos fotossintéticos (34%) (Figura 7). Dentre estas estão as ATPases (*spots* 75, 80, 215, 229, 352, 414, 533 e 561) e as ribuloses (*spots* 4, 81, 301, 338, 435, 503 e 512).

Nas amostras radiculares, a maioria das proteínas diferencialmente acumuladas está relacionada a outras funções e processos metabólicos (30% e 27%, respectivamente) (Figura 8). Dentre estas outras funções, temos função desconhecida (*spots* 131, 255, 581 e 662), dobramento de proteínas (*spots* 39, 41 e 290), atividade de endopeptidase (*spots* 42, 359 e 610), transporte aniônico (*spots* 86, 88 e 482), transdução de sinal (*spot* 107), ubiquitinação (*spot* 258), utilização de carbono (*spot* 303), alongamento da tradução (*spot* 550) e iniciação da translação (*spot* 617). Relacionada aos processos metabólicos, temos proteassomas (*spot* 79, 100, 296, 477, 486 e 494), triose fosfatase (*spot* 63, 82 e 376), entre outras e às respostas de defesa e estresse temos proteassomas (*spot* 2 e 294), dismutase do superóxido (*spot* 33), peroxidases (*spot* 391, 420 e 498), catalase (*spot* 553), dentre outros.

Neste trabalho, doze proteínas de amostras radiculares foram detectadas em mais de um *spot*, como por exemplo o *spot* 39 (2 *spots* com a mesma proteína), *spot* 42 (4 *spots* com a mesma proteína), *spot* 82 (2 *spots* com a mesma proteína), *spot* 86 (2 *spots* com a mesma proteína), *spot* 88 (2 *spots* com a mesma proteína), *spot* 246 (2 *spots* com a mesma proteína), *spot* 255 (3 *spots* com a mesma proteína), *spot* 353 (8 *spots* com a mesma proteína), *spot* 359 (2 *spots* com a mesma proteína) e *spot* 498 (2 *spots* com a mesma proteína). A presença destes *spots* múltiplos pode estar relacionada aos *spots* próximos,

modificações pós-traducionais ou mesmo à hidrólise proteica durante o processamento das amostras e extração de proteínas.

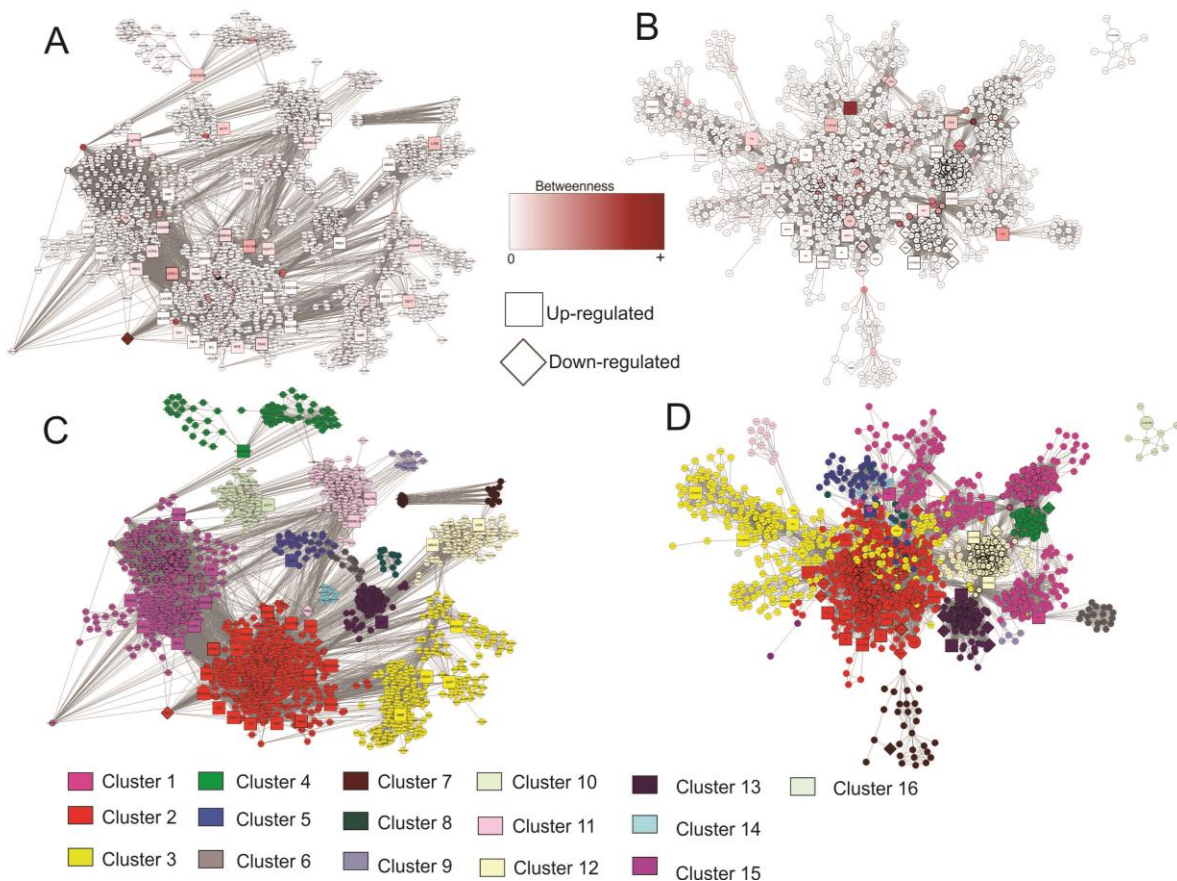
#### 4.5 Rede de interação proteica

A interação das proteínas foi observada por meio da construção de duas redes de interação proteica de todas as proteínas identificadas, tanto das amostras foliares quanto radiculares, por meio do software STRING 10.5.

A rede de interação proteica das amostras foliares e radiculares que utilizou proteínas ortólogas de *A. thaliana* mostrou a presença de 1777 proteínas (nós) e 33291 conectores nas amostras foliares e 1597 proteínas (nós) e 32261 conectores nas amostras radiculares, com um nível de confiança de 0,7. Das 46 sequências ortólogas de proteínas das amostras foliares encontradas no BLAST recíproco com *A. thaliana*, 38 estavam localizadas dentro da rede. Já as amostras radiculares, das 63 sequências ortólogas de proteínas, 40 estavam localizadas dentro da rede, e eles são representados em tamanhos de nós maiores (Figura 11). Um levantamento da ontologia genética para os processos biológico de todas as proteínas na rede foi realizado usando o plugin BiNGO.

Ao avaliar as redes de interações em níveis foliares (Figura 11 A) e radiculares (Figura 11 B) e a reconstrução dessas redes por meio da separação por *clusters* (Figura 11 C e D), verifica-se que as amostras foliares apresentaram 14 *clusters*: (i) *cluster* 1 - proteínas relacionadas a tradução que contém 218 proteínas, sendo que destas 8 são ortólogas (VHA-A, VDAC1, RBLC, ATPA, AT5G08680, PB, RRF e At1g07940) onde a maioria foi *up-regulated*, (ii) *cluster* 2 - proteínas relacionadas aos processos metabólicos que contém 356 proteínas, sendo que destas 17 são ortólogas (RCA, RBCS1B, LHCB5, ATPC1, FNR1, AT5G53490, PMDH2, AT1G11860, GGAT1, AT2G21250, AT2G45290, AT3G11630, FBA2, RPE, TPI, FBA1 e CA1) onde a maioria foi *up-regulated*, (iii) *cluster* 3 - proteínas relacionadas aos processos de biossíntese que contém 184 proteínas, sendo que destas 4 são ortólogas (GME, ADG1, VEP1 e ARGAH1) onde todas foram *up-regulated*, (iv) *cluster* 4 - proteínas relacionadas aos processos metabólicos do RNA que contém 38 proteínas, sendo que destas 1 é ortóloga (AT2G15220) onde é *up-regulated*, (v) *cluster* 5 - proteínas relacionadas a aminoacilação na tradução de proteínas que contém 32 proteínas, sendo que

destas 1 é ortóloga (VAR2) onde é *up-regulated*, (vi) *cluster 6* - proteínas relacionadas a resposta ao estresse que contém 10 proteínas, sendo que destas nenhuma é ortóloga, (vii) *cluster 7* - proteínas relacionadas ao processamento do RNA que contém 11 proteínas, sendo que destas nenhuma é ortóloga, (viii) *cluster 8* - proteínas relacionadas a assimilação de sulfato que contém 9 proteínas, sendo que destas nenhuma é ortóloga, (ix) *cluster 9* - proteínas relacionadas a determinação do meristema floral que contém 5 proteínas, sendo que destas nenhuma é ortóloga, (x) *cluster 10* - proteínas relacionadas a organização do citoesqueleto que contém 54 proteínas, sendo que destas 1 é ortóloga (ACT7) onde é *up-regulated*, (xi) *cluster 11* - proteínas relacionadas ao dobramento proteico que contém 104 proteínas, sendo que destas 2 são ortólogas (HSP60-2, Hsp70b) onde todas foram *up-regulated*, (xii) *cluster 12* - proteínas relacionadas ao processamento do DNA que contém 94 proteínas, sendo que destas 2 são ortólogas (MSH3, LIG6) onde todas foram *up-regulated*, (xiii) *cluster 13* - proteínas relacionadas ao processo catabólico da proteína que contém 82 proteínas, sendo que destas 1 é ortóloga (PBG1) onde é *up-regulated* e (xiv) *cluster 14* - proteínas relacionadas a fotorrespiração que contém 5 proteínas, sendo que destas nenhuma é ortóloga.



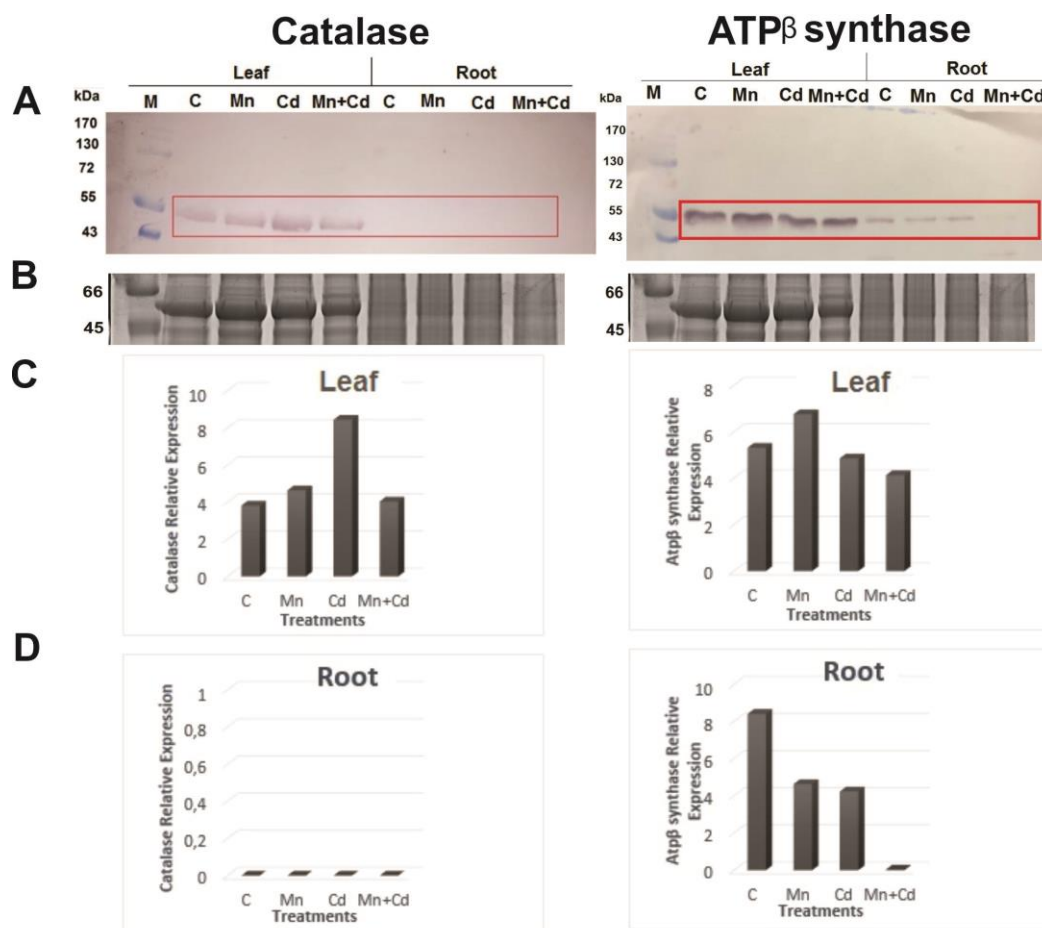
**Figura 11** – Rede de interação das proteínas identificadas das amostras foliares e radiculares de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos de Cd, Mn e Cd+Mn no solo. **A** – Rede de interação das amostras foliares; **B** – rede de interação das amostras radiculares; **C** – rede de interação das amostras foliares separadas por *clusters*; **D** – rede de interação das amostras radiculares separadas por *clusters*. As interações foram geradas e visualizadas no *software STRING* 10.5 com nível de confiança 0.70 e reconstruídas pelo *software Cytoscape*.

As amostras radiculares foram divididas em 16 *clusters*: (i) *cluster* 1 - proteínas relacionadas à resposta a estresse que contém 227 proteínas, sendo que destas 4 são ortólogas (LIG6, CPN20, CSD1, CAT) onde a maioria foram *up-regulated*, (ii) *cluster* 2 - proteínas relacionadas a geração de metabólitos precursores e energia que contém 317 proteínas, sendo que destas 17 são ortólogas (RBCS1A, LHCA3, FBA2, TPI, GAPC2, PGK, AT1G20950, TIM, FNR2, GAPC1, NADP-ME3, SDH1, A3G19480, ATPA, VDAC1, CA2, ACO3) onde a maioria foram *up-regulated*, (iii) *cluster* 3 - proteínas relacionadas ao aminoácido celular e processo metabólico derivado que contém 217 proteínas, sendo que destas 7 são ortólogas (AT5G66220, AT1G68850, PA2, SFGH, ADH1, AT5G39580, ATMS1) onde a maioria foram *up-regulated*, (iv) *cluster* 4 - proteínas relacionadas ao processamento do RNA que contém 20 proteínas, sendo que destas 1 é ortóloga (AT2G21130) onde é *down-regulated*, (v) *cluster* 5 - proteínas relacionadas ao processo metabólico da trealose que contém 25 proteínas, sendo que destas 1 é ortóloga (AT2G2280) onde é *up-regulated*, (vi) *cluster* 6 - proteínas relacionadas ao processamento do RNA 3' final que contém 11 proteínas, sendo que destas nenhuma é ortóloga, (vii) *cluster* 7 - proteínas relacionadas a resposta a defesa que contém 21 proteínas, sendo que destas 1 é ortóloga (OSM34) onde é *down-regulated*, (viii) *cluster* 8 - proteínas relacionadas ao transporte de ânion que contém 3 proteínas, sendo que destas nenhuma é ortóloga, (ix) *cluster* 9 - proteínas relacionadas a regulação do ciclo celular que contém 3 proteínas, sendo que destas nenhuma é ortóloga, (x) *cluster* 10 - proteínas relacionadas ao transporte de lipídeo que contém 7 proteínas, sendo que destas 1 é ortóloga (AT1G17860) onde é *up-regulated*, (xi) *cluster* 11 - proteínas relacionadas ao transporte mediado por vesículas que contém 8 proteínas, sendo que destas nenhuma é ortóloga, (xii) *cluster* 12 - proteínas relacionadas a tradução que contém 141 proteínas, sendo que destas

3 são ortólogas (AT1G07920, AT4G27090, At1g07940) onde a maioria foram *up-regulated*, (xiii) *cluster* 13 -proteínas relacionadas ao processo catabólico de proteínas que contém 82 proteínas, sendo que destas 6 são ortólogas (AT1G79210, PBG1, PAD1, PBF1, PRC3, PAG1) onde a maioria foram *down-regulated*, (xiv) *cluster* 14 - proteínas relacionadas a ferro-enxofre que contém 4 proteínas, sendo que destas nenhuma é ortóloga, (xv) *cluster* 15 - proteínas relacionadas a regulação positiva da via de sinalização mediada por ácido abscísico que contém 2 proteínas, sendo que destas nenhuma é ortóloga e (xvi) *cluster* 16 - proteínas relacionadas a importação de íons de potássio que contém 2 proteínas, sendo que destas nenhuma é ortóloga.

#### 4.6 **Western Blot**

O acúmulo de algumas proteínas nas amostras foliares e radiculares de plantas jovens cacau submetidas aos tratamentos com doses de Mn, Cd e Mn+Cd foi analisado por *western blot*. Observou-se a detecção da proteína catalase principalmente nas amostras foliares na presença de Cd, cujo acúmulo foi maior (Figura 12), ao passo que nos tratamentos controle e Cd+Mn houve menor acúmulo desta proteína, com valores estatisticamente semelhantes (Figura 12).



**Figura 12** – *Western blot* utilizando o anticorpo contra catalase e Subunidade  $\beta$ -ATP sintase das amostras foliares e radiculares de plantas jovens de cacau submetidas aos tratamentos de Cd, Mn e Cd+Mn no solo. **A** - C (controle: sem adição de Mn e Cd no solo); Mn ( $1,6 \text{ mmol kg}^{-1}$  solo); Cd ( $0,8 \text{ mmol kg}^{-1}$  solo) e Cd+Mn ( $0,4 \text{ mmol Cd kg}^{-1}$  solo +  $0,8 \text{ mmol Mn kg}^{-1}$  solo). kDa corresponde  a massa molecular; **B** – Gel espelho; **C** – Acúmulo desta proteína nas amostras foliares; **D** – Acúmulo desta proteína nas amostras radiculares estimado por meio do programa Gel Quant Net 8.0

Utilizou-se também o anticorpo contra a Subunidade  $\beta$ -ATP sintase para deteco desta proteína nas amostras foliares e radiculares de plantas jovens cacao submetidas aos tratamentos com doses de Mn, Cd e Cd+Mn. O acúmulo da Subunidade  $\beta$ -ATP sintase nas amostras foliares foi maior no tratamento com Mn e menor no tratamento com Mn+Cd. Já nas amostras radiculares foi mais acumulada no tratamento controle e menos acumulada no tratamento com Mn+Cd (Figura 12).

## 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi obtido um perfil proteico distinto para as folhas e para raízes de plantas jovens de cacau submetidas à tratamentos com Cd, Mn e Cd+Mn. Nas folhas houve um maior número de *spots* nos tratamentos com Cd, Mn e Cd+Mn em relação controle, principalmente no tratamento com Mn, onde a quantidade de *spots* foi maior, seguido do tratamento com Cd (Figuras 2 e 4). Isso demonstra que a presença dos metais no solo induziu a expressão de proteínas em folhas de cacau, que podem estar associadas às respostas ao estresse por metais tóxicos. Rao et al. (2017) obtiveram resultados semelhantes em plantas de *Curcuma longa*, cujas folhas também apresentaram um aumento do número de *spots* no tratamento com Cd em relação ao controle. O Cd induz mecanismos de defesa, desenvolvido pelas plantas, para tolerância à exposição aos metais tóxicos. Um destes mecanismos se refere ao sistema oxidante de defesa, composto por um conjunto de enzimas antioxidantes capaz de remover, neutralizar ou eliminar as ERO's (SCANDALIOS, 2005). Por outro lado, o excesso de Mn influencia a fixação de CO<sub>2</sub> e, conseqüentemente, a fotossíntese, interferindo no proteoma e no transcriptoma, provocando um aumento no número de *spots* (FÜHR et al., 2008).

A expressão de proteínas nos tratamentos com Cd e Cd+Mn em relação ao controle nas amostras radiculares demonstra que estas podem estar associadas às respostas ao estresse induzido por metais tóxicos. Além disso, somente no tratamento com Mn que houve repressão da expressão dessas proteínas. De acordo com Lin et al. (2009), a toxicidade de Cd afeta o proteoma global em raízes e folhas de *Oryza sativa*, induzindo um aumento na expressão das proteínas nos dois órgãos, quando as plantas são expostas a 0,1 ou 1,0 mmol Cd L<sup>-1</sup>. Ao avaliar a toxicidade de metais em *C. sinensis*, You et al. (2014) observaram uma diminuição de proteínas no tratamento com Mn em relação ao controle, identificando 11 *spots* induzidos e 42 *spots* reprimidos. Este elemento metálico é o principal componente na estrutura de PS2 da fase fotoquímica da fotossíntese, que fornece elétrons para a molécula de clorofila ativada (WHITE; GREENWOOD, 2013), além de estar associado à síntese de clorofila e a formação e multiplicação de cloroplastos que ocorre nas folhas (DECHEN; NACHTIGALL, 2006).



Das 46 proteínas identificadas em nível foliar, três foram reprimidas e 17 foram induzidas na presença de Cd, ao passo que na presença de Mn e de Cd+Mn quatro foram reprimidas e 14 induzidas, respectivamente. A presença de proteínas diferencialmente acumuladas induzidas por Cd e reprimidas por Cd+Mn, a exemplo da ATP sintase subunidade gama (*spot* 75) e da GDP-manose 3,5 epimerase (*spot* 74), demonstra a interferência de Mn na toxicidade de Cd. ATPases ligadas às membranas celulares fornecem energia e um gradiente de H<sup>+</sup> para o co-transporte de Cu, Co, Pb e Cd, com prótons usados para a desintoxicação desses íons metálicos em plantas (CAO et al. 2014). Para mitigar os efeitos tóxicos de Cd, a planta exige uma grande quantidade de energia (CARNEIRO et al., 2017). Durand et al. (2010) identificaram cinco ATPases no tecido foliar de *Populus nigra*, e verificaram que três pertenciam aos cloroplastos e tiveram suas expressões inibidas, ao passo que as outras duas foram expressas e pertenciam aos mitocôndrios. No presente estudo e nos estudos realizados por Cheng et al. (2018) e Cao et al. (2014), esta proteína foi induzida na presença de Cd.

Da mesma forma, uma diminuição na GDP-manose 3,5 epimerase, uma enzima chave envolvida na síntese da via do ascorbato (WOLUCKA et al., 2003) poderia resultar em diminuição no teor de ascorbato, aumentando o desequilíbrio da geração/desintoxicação de ERO's. O ascorbato (vitamina C) funciona como cofator de enzimas na via Halliwell-Asada e como antioxidante (KIEFFER et al., 2008). No presente estudo esta proteína foi induzida na presença de Cd e reprimida na presença de Mn+Cd. Kieffer et al. (2008) mostrou que esta proteína foi reduzida na presença de Cd.

Das 63 proteínas identificadas nas raízes, 21 foram reprimidas e 18 foram induzidas na presença de Cd, ao passo que na presença de Mn 20 foram reprimidas e 16 foram induzidas no tratamento com Cd+Mn. Dentre as diferencialmente acumuladas induzidas por Cd e reprimidas pela combinação Cd+Mn, se encontram a isoflavona redutase (*spot* 115), aconitase 3 (*spot* 272), proteassoma subunidade alfa (*spot* 2), gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (*spot* 147), pirofosfato-frutose-6-fostato-1-fosfotransferase (*spot* 244), porina (*spot* 88), larreatricina hidrolase (*spot* 158) e sintase independente de cobalamina (*spot* 255). O gene responsável pela síntese de isoflavona é induzido em condições de estresses abióticos e bióticos em raízes, conferindo

tolerância ao estresse oxidativo (SHOJI et al., 2002; KIM et al., 2003; KIM et al., 2008; KIM et al., 2010; YAMAGUCHI et al., 2010). A isoflavona redutase também está envolvida na síntese dos fenilpropanóides, que são importantes para a resposta ao estresse, assim como a síntese de fitoalexinas que ajudam a aumentar a tolerância em plantas submetidas a diferentes estresses abióticos (HENKES et al., 2001; DONG et al., 2015). Vale destacar que no presente trabalho esta proteína foi induzida na presença de Cd e não foi detectada na presença de Mn+Cd, mostrando que o Mn mitigou a toxicidade de Cd em plantas jovens de cacau. O mesmo fato foi observado em estudos com Cd realizados por Hradilová et al. (2010) e Nascimento et al. (2018).

A atividade da aconitase 3 está intimamente ligada ao metabolismo primário de carbono e à regulação do balanço redox celular (MOEDER et al., 2007). Ao fornecer o substrato para a isocitrato desidrogenase, que catalisa a descarboxilação oxidativa do isocitrato em  $\alpha$ -cetogluturato, CO<sub>2</sub> e NADH, a aconitase pode contribuir para a disponibilidade de equivalentes redutores sob condições de estresse (MHAMDI et al., 2010). Além disso, alguns estudos também relacionaram a atividade citoplasmática da aconitase com a rede antioxidante e a regulação da morte celular programada em plantas (MOEDER et al., 2007). Vale ressaltar que no presente trabalho a aconitase foi induzida na presença de Cd e reprimida na presença de Cd+ Mn, mostrando, mais uma vez, que Mn mitigou a toxicidade de Cd em plantas jovens de cacau.

Numerosos estudos proteômicos relacionados à toxicidade de Cd relatam a indução de várias proteínas associadas à proteólise, tais como as proteassomas, e sugerem que a degradação de proteínas oxidadas (carboniladas) pela via do proteassoma é susceptível de desempenhar o seu papel importante na resistência à toxicidade de Cd (VILLIERS et al., 2011). As proteínas relacionadas com proteólise desempenham papéis importantes na remoção de proteínas com dobragem incorreta, anormal e misturada, e são necessárias para manter a homeostase celular (ZHANG et al., 2017). Além de desempenhar uma função essencial na tolerância ao estresse oxidativo em plantas (KUREPA et al., 2008). Neste trabalho, a proteassoma subunidade alfa foi induzida na presença de Cd e reprimida na presença de Cd+Mn, mostrando que Mn mitigou a toxicidade de Cd em cacau. Nos estudos de Kieffer et al. (2008), Aloui et al. (2009), Kieffer et al. (2009) e Lee et al. (2010) também foram

relatados aumento do teor desta proteína na presença de Cd, ao passo que em estudos realizados por Chora et al. (2009) houve uma diminuição no teor desta proteína em plantas exposta ao Cd.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) desempenha um papel fundamental na glicólise. Vescovi et al. (2013) descobriram que a isoenzima GAPDH citosólica GAPC1 pode desempenhar um papel na sinalização de estresse oxidativo ou proteção nas raízes de *Arabidopsis* sob estresse de Cd. No presente estudo, esta proteína foi induzida por Cd e reprimida por Cd+Mn. Em estudo similar, com plantas de *Crocus sativus* submetidas à toxicidade de Cd, foi também demonstrado um aumento do teor desta proteína em nível foliar (RAO et al., 2017). Fato também observado por Hossain et al. (2012) em estudo com toxicidade de Cd em plantas de *Glycine max*. Em contrapartida, Aloui et al. (2009) observaram repressão desta proteína em raízes de plantas de *Medicago truncatula* e D'Alessandro et al. (2013) em folhas de plantas de *Brassica juncea* submetidas à toxicidade de Cd.

A pirofosfato-frutose-6-fosfato-1-fosfotransferase (PFP) catalisa a interconversão reversível entre a frutose-6-fosfato e frutose-1,6-bisfosfato, um passo limitante da taxa na regulação do fluxo metabólico dos carboidratos primários da glicólise ou gliconeogênese (BASSON et al., 2011). PFP utiliza pirofosfato (PPi) como uma alternativa de doador no lugar de ATP durante a fosforilação de Fru-6-P para Fru-1,6-P<sub>2</sub> e isso, conseqüentemente, fornece uma vantagem energética para as plantas (LIM et al., 2009). Além disso, PFP possui várias funções incluindo adaptabilidade geral a estresses (LIM et al., 2013). Neste estudo, esta proteína foi induzida na presença de Cd e reprimida na presença de Cd+Mn. A indução desta proteína também relatada por Gillet et al. (2006) em *Chlamydomonas reinhardtii* na presença de Cd.

As porinas da membrana externa mitocondrial de 36 kDa, também encontradas como canal seletivo de ânions dependente de voltagem mitocondrial (VDAC), são as proteínas mais abundantes na membrana externa mitocondrial (MAYER et al., 1993). Estas moléculas têm como função a troca de íons e pequenas moléculas, incluindo NADH e ATP, através da membrana mitocondrial externa (YONG, 2007). Um dos papéis mais intrigantes da porina é sua participação no início da apoptose, onde o citocromo c é liberado no citoplasma para induzir a morte celular programada (KROEMER et al., 2007).

Por outro lado, Homblé et al. (2017) sugerem que a porina esteja envolvida na resposta ao estresse oxidativo, que inclui a hexoquinase citosólica e a ligação da tioredoxina ao VDAC. Isso, por sua vez, pode influenciar a troca de moléculas entre os mitocôndrios e o citosol. O que corrobora com o nosso trabalho visto que na presença de Cd esta proteína foi induzida demonstrando resposta ao estresse oxidativo, e, na presença de Cd+Mn esta proteína foi reduzida, demonstrando então a mitigação da toxicidade do Cd.

A larreatricina hidroxilase é um polifenol oxidase enantio-específica (PPO) (CHO et al., 2003). Esta proteína está envolvida na formação do ácido nordiidroguaiarético (NDGA) e de ligninas (DAVIN et al., 2003). PPOs vegetais são frequentemente consideradas proteínas de defesa, devido à sua expressão induzida por herbívoros, patógenos e ferimentos (THIPYAPONG et al., 1995; CONSTABEL et al., 1998). Além disso, prevê-se que a maioria dos PPOs esteja localizada no cloroplasto, enquanto seus substratos fenólicos se acumulam no vacúolo. Assim, as enzimas podem entrar em contato com o seu substrato somente se as células forem rompidas, durante um dano tissular (CONSTABEL et al., 1996). No entanto, alguns PPOs bem caracterizados parecem ter papéis muito específicos na biossíntese de metabólitos especializados via atividades de tirosinase (monofenol oxidase) e catecoloxidase (SULLIVAN et al., 2015). Por ser uma proteína de defesa, esta demonstrou no presente trabalho, induzida na presença de Cd e não foi possível sua detecção no tratamento com Cd+Mn o que também demonstra uma mitigação da toxicidade de Cd por Mn.

A sintase independente de cobalamina, também chamada vitamina B12, é necessária para a regulação da síntese de DNA durante a divisão celular (WARREN et al. 2002; SMITH et al. 2007; MOHAMED; NAHEIF, 2013). No trabalho realizado por Alvarez et al. (2009), esta proteína também foi regulada positivamente em resposta a exposição ao Cd. A indução de enzimas envolvidas na assimilação de sulfato em cisteína e metionina sugere que a absorção de sulfato provavelmente aumente a resposta ao Cd nas raízes de *B. juncea* e *Zea mays* (ROTH et al., 2006). Sob estresse de Cd, a disponibilidade de sulfato para a síntese de peptídeos de ligação a metais pesados, como a glutatona e as fitoquelatinas (SPEISER et al., 1992; GASIC et al., 2006), pode limitar a tolerância ao Cd (NOCITO et al., 2006). O que corrobora com o presente estudo, visto que, esta proteína na presença de Cd foi induzida,

mostrando uma resposta ao Cd, e na presença de Cd+Mn esta proteína foi reprimida.

Dentre as proteínas diferencialmente acumuladas em raiz de plantas jovens de cacau, que foram reprimidas na presença de Cd e induzidas na presença de Cd+Mn, temos a D-3-Fosfoglicerato desidrogenase (*spot* 308), chaperonina 20 (*spot* 56), proteassoma subunidade beta (*spot* 294), triose fosfatase isomerase (*spot* 63) e osmotina (*spot* 323). A D-3-Fosfoglicerato desidrogenase é uma enzima chave na biossíntese de L-serina (ZHANG et al., 2017). Nos organismos, a L-serina é produzida a partir do intermediário glicolítico D-3-fosfoglicerato (PGA) e a primeira enzima na via biossintética da L-serina é a D-3-fosfoglicerato desidrogenase (PGDH) (GRANT, 2018). Além de ser um precursor da D-Serina, a L-serina é também um precursor para a produção de metabólitos como glicina, cisteína, triptofano, fosfatidil L-serina, esfingolipídios, purinas, porfirinas, glioxalato e glicina (NELSON et al., 2009; VOET e VOET, 2011). No presente trabalho a PGDH não foi encontrada na presença de Cd, mas induzida na presença de Cd+Mn. Isso sugere que Mn tenha mitigado a toxicidade de Cd em plantas de cacau, induzindo a produção de L-serina.

A chaperonina molecular desempenha papel vital na estabilização, dobramento, montagem e translocação de proteínas sob estresse abiótico (KOMATSU; HOSSAIN, 2013). No trabalho de Cheng et al. (2018) a abundância da chaperonina 20 (CPN20) foi aumentada sob estresse osmótico e Cd<sup>2+</sup> após 4 dias de tratamento. A CPN20 pode mediar a ativação de Fe-SOD em cloroplastos em resposta ao estresse por Cd<sup>2+</sup> (SARRY et al., 2006; KUO et al., 2013). Em trabalho realizado por Rao et al. (2017) a chaperonina também foi significativamente regulada negativamente na presença de Cd.

A proteína proteassoma é responsável na degradação seletiva de proteínas reguladoras, e é fundamental na regulação de processos celulares, incluindo as respostas de defesa e tolerância ao estresse (LECHNER et al., 2006; PAQUIS et al., 2011). A proteína proteassoma é responsável não apenas pela eliminação de proteínas mal dobradas, mas também muitos processos regulatórios pelos quais se remove enzimas metabólicas desnecessárias ou mesmo prejudiciais e regulam os níveis de muitas proteínas reguladoras (HOCHSTRASSER, 1995; HILT; WOLF, 1996). A via está implicada no controle

da homeostase celular, crescimento e desenvolvimento (CIECHANOVER, 1994; LARSEN; FINLEY, 1997), incluindo a progressão do ciclo celular, manutenção da estrutura da cromatina, reparo do DNA, regulação enzimática, transcrição, transdução de sinal e apoptose, etc. (FAN et al., 2004). A proteossoma subunidade beta tipo 1 (PSM $\beta$ 1) provavelmente desempenha um papel importante na regulação da apoptose (FAN et al., 2004). A PSM $\beta$ 1, ao contrário da alfa, não foi detectada no tratamento com Cd e induzida no tratamento com Mn+Cd em cacau. Estudos similares foram encontrados em *B. juncea* no trabalho realizado por D'Alessandro et al. (2013).

A triose fosfato isomerase (TPI) catalisa a interconversão de gliceraldeído-3-fosfato em diidroxiacetona fosfato, metabólitos que fazem parte de diferentes rotas do metabolismo de carboidratos para geração de energia e formação de esqueleto carbônico para reações de biossíntese (CURTO et al., 2006). No trabalho de Ge et al. (2009), a triose fosfato isomerase foi regulada positivamente no tratamento com Cd, o que sugere que a superexpressão de TPI é necessária para maiores necessidades de recurso de carbono para sintetizar aminoácidos e proteínas (DORION et al., 2005).

Osmotinas são proteínas multifuncionais também pertencentes à família das PR-5 e estão envolvidas em osmotolerância e possuem atividade antifúngica contra um amplo espectro de fungos patogênicos (HUSAINI; ABDIN, 2008; ABDIN et al., 2011). Além disso, foi descrito em *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana tabacum* e *Fragaria vesca* transgênicos, expressando essa proteína, um aumento da tolerância a estresse salino (ABADA et al., 1996; HUSAINI; ABDIN, 2008). No trabalho de Nascimento et al. (2018) o acúmulo de osmotina também foi reduzido em plantas de *Elaeis guineensis* Jacq. sob estresse.

Nas folhas de plantas jovens de cacau, a maioria das proteínas mais acumuladas, na presença de Cd, Mn e Cd+Mn, está envolvida em processos fotossintéticos, seguidos de processos metabólicos (Figura 9). Fato também relatado por Cheng et al. (2018) em plantas de *Brachypodium distachyon* submetidas à toxicidade de Cd e estresse osmótico, cujo acúmulo de proteínas relacionadas a fotossíntese e a processos metabólicos foram de 34% e 21%, respectivamente. Estudos realizados por Junior et al. (2015) com *Helianthus annuus* demonstraram que os processos fotossintéticos foram os mais afetados pelo Cd, apesar desta espécie apresentar alta tolerância ao Cd. Processos

fotossintéticos em plantas se mostraram vulneráveis a metais tóxicos, em função da concentração e do tempo de exposição (BOUCHER; CARPENTIER, 1999; TANYOLAÇ et al., 2007; EKMEKÇI et al., 2008). Mais especificamente, o complexo coletor de luz de PS2, que é particularmente sensível a danos por metais tóxicos, especialmente em ambientes de baixa intensidade de luz, ao passo que os centros de reação de PS2 apresentam danos em condições de alta intensidade de luz (KÜPPER et al., 2002). Além disso, o estresse induzido pelo metal tóxico resulta em diminuição da síntese de clorofila e de carotenóides, declínio na taxa de transporte fotossintético de elétrons, inibição da atividade e síntese enzimática do ciclo de Calvin, bem como alteração da ultraestrutura do cloroplasto (SEREGIN; IVANOV, 2001).

Cádmio afeta muitos processos fisiológicos e bioquímicos importantes em plantas, como a fotossíntese e a homeostase de nutrientes minerais, o que, por sua vez, inibe o crescimento e desenvolvimento normal das plantas (CLIJSTERS; VAN ASSCHE, 1985; CAO et al., 2014). No estudo de Rao et al. (2017) com plantas de *Crocus sativum* o estresse por Cd afetou o funcionamento normal do cloroplasto, reduzindo a fotossíntese e a tradução. Em contrapartida, estudos realizados por Arena et al. (2017), com plantas de *Cynara cardunculus* submetidas à toxicidade de Cd, não demonstraram declínio na fase fotoquímica da fotossíntese. Segundo estes autores, é provável que Cd acumulado nos tecidos da parte aérea da planta desencadeie mecanismos de defesa, aumentando o nível de proteínas envolvidas na fotossíntese, onde a Rubisco e a proteína D1 aumentaram 7 e 4,5 vezes respectivamente, como uma resposta compensatória para neutralizar os danos do cloroplasto.

Nas raízes de plantas jovens de cacau, a maioria das proteínas mais acumuladas, na presença de Cd, Mn e Cd+Mn, está envolvida em outras funções, seguidas de processos metabólicos (Figura 10). Com relação às proteínas de outras funções temos várias proteínas relacionadas ao dobramento de proteínas. Pois, o estresse abiótico pode resultar em muitas proteínas sendo dobradas incorretamente, que, em seguida, afetam sua montagem e função normal. Portanto, proteínas relacionadas à degradação e ao dobramento de proteínas geralmente mostram mudanças significativas, quando as plantas são submetidas a estresse abiótico (CHENG et al., 2018). Com relação a proteínas do metabolismo, uma regulação positiva de transcritos envolvidos no aumento

do metabolismo energético é observada em resposta ao estresse biótico e abiótico (LESS et al., 2011). Componentes do metabolismo primário estão envolvidos na defesa em plantas (ROJAS et al., 2014) e a produção de energia é fundamental para a expressão de genes para a biossíntese de proteínas envolvidas em mecanismos de resposta ao estresse (SCHEIDELER et al., 2002). Por outro lado, as proteínas de defesa e estresse ao Cd podem induzir moléculas sinalizadoras (ET) que, subsequentemente, ativam proteínas responsivas ao Cd. Isto, por sua vez, eleva a expressão de proteínas relacionadas aos antioxidantes que podem eliminar o acúmulo de ERO's induzido por Cd, ao transporte de Cd para os vacúolos e ao sequestro de Cd em paredes celulares, que contribuem para a diminuição do  $Cd^{2+}$  disponível do citosol (RAO et al., 2017).

Tanto estresse biótico quanto abiótico podem causar o enrolamento incorreto da proteína ou o acúmulo de proteínas desdobradas, que é percebido como estresse do retículo endoplasmático (RE) por proteínas sensoras específicas na membrana do RE (ZHU, 2016). Essa detecção leva à expressão de genes que codificam chaperonas e outras proteínas importantes para aumentar a capacidade de dobramento de proteínas, degradação associada ao ER (ERAD) ou supressão da tradução de proteínas para reduzir a quantidade de proteínas sintetizadas carregadas no ER por meio do ER eIF2a quinase do tipo PKR (WALTER; RON, 2011).

O anticorpo contra a subunidade  $\beta$ -ATP sintase se acumulou mais na presença de Mn em folhas e no tratamento controle em raízes de plantas jovens de cacau (Figura 12). A ATP sintase mitocondrial é o principal complexo enzimático do metabolismo energético, fornecendo ATP para a célula. Subunidades dessa enzima são superexpressas sob condições de estresse, fornecendo energia adicional necessária para a manutenção da homeostase celular (MOGHADAM et al., 2012). Esta enzima é responsável por vários mecanismos de regulação, modulando sua atividade segundo as mudanças ambientais (KONNO et al., 2006). A subunidade  $\beta$ -ATP sintase participa do transporte de prótons através da membrana, gerando um gradiente eletroquímico e regulação da síntese de ATP (ANDERSSON et al., 2009).

No trabalho realizado por Cheng et al. (2018), a subunidade  $\beta$ -ATP sintase aumentou sua abundância sob estresse osmótico e  $Cd^{2+}$  após 4 dias de



tratamento em comparação com o controle e ao estresse combinado em plantas de *Brachypodium distachyon*. O mesmo fato foi observado por D'Alessandro et al. (2013) em plantas de *Brassica juncea* submetidas a estresse por Cd. Em contrapartida, Fagioni et al. (2009) observaram que a ATPase permaneceu constante durante o desenvolvimento do estresse de Cd em plantas de *Spinacia oleracea*. Entretanto, Marmioli et al. (2013) verificaram em plantas de *Populus ssp.* que o estresse induzido por Cd diminuiu o teor de ATP sintase.

A catalase se acumulou mais nas folhas das plantas jovens de cacau na presença de Cd, cujo acúmulo foi 2x maior em relação ao tratamento controle (Figura 12). Por outro lado, não foi possível a sua detecção em nível de raízes. Isso, por sua vez, demonstra a existência de maior estresse oxidativo em nível foliar na presença de Cd, resultante do acúmulo de ERO's que não foram totalmente eliminados pelos sistemas antioxidativos enzimáticos e não enzimáticos, motivo pelo qual houve indução da biossíntese de catalase para eliminação do excesso de peróxido de hidrogênio. Por outro lado, a diminuição na produção de catalase no tratamento Cd+Mn, à semelhança do tratamento controle, demonstra o papel de Mn na mitigação da toxicidade de Cd em plantas jovens de cacau.

A catalase (CAT) é uma enzima heme representativa destinada a metabolizar espécies reativas de oxigênio provocadas pelo estresse e controlar seus potenciais impactos no metabolismo e funções celulares (ANJUM et al., 2016). Representa um dos principais mecanismos enzimático de eliminação de  $H_2O_2$  em plantas, e é crucial para a supressão de níveis tóxicos de  $H_2O_2$  em uma célula (APEL e HIRT, 2004). CAT converte diretamente  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $1/2 O_2$  e está mais envolvida na desintoxicação de  $H_2O_2$  do que na regulação como uma molécula de sinalização em plantas (CUYPERS et al., 2011). Além disso, o aumento da abundância de enzimas antioxidantes, como a catalase, garante proteção celular contra danos mediados por espécies reativas de oxigênio sob estresse por Cd (HOSSAIN et al., 2012). Trabalho realizado por Hossain et al. (2012) também evidenciou o aumento na expressão de CAT entre as proteínas relacionadas à defesa induzidas pelo Cd. Fato também observado por Carneiro et al. (2017), avaliando plantas de *Arabidopsis thaliana* estressadas por Cd, cujo o aumento de CAT foi 3,5x em relação ao tratamento controle.

## 6. CONCLUSÕES

Na presença de Cd, Mn e Cd+Mn, houve maior expressão de proteínas diferencialmente acumuladas nas raízes do que nas folhas de plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51. As proteínas diferencialmente acumuladas nas folhas foram igualmente reprimidas e induzidas nos diferentes tratamentos, já nas raízes a maioria das proteínas foi reprimida, mostrando que os tratamentos Cd, Mn e Cd+Mn afetaram a expressão destas proteínas.

Proteínas exclusivas foram induzidas por Cd, Mn e Cd+Mn tanto nas folhas quanto nas raízes. Nas folhas, houve maior indução na presença de Mn e de Cd, ao passo que nas raízes foi na presença de Cd e de Cd+Mn.

A toxicidade de Cd afetou proteínas de resposta à defesa e estresse nas folhas e proteínas dos processos metabólicos nas raízes. A combinação de Cd+Mn promoveu maior acúmulo de proteínas envolvidas em processos metabólicos em folhas e de proteínas envolvidas em resposta à defesa e estresse nas raízes.

A maioria das proteínas induzidas em nível foliar está envolvida em processos fotossintéticos e processos metabólicos, ao passo que a maioria das induzidas em nível radicular está envolvida em outras funções e processos metabólicos quando expostas a presença de Cd, Mn e Cd+Mn.

Proteínas envolvidas em processos de oxidorredução e resposta de defesa e estresse, além de outros processos, foram induzidas na presença de Cd e reprimidas na presença de Cd+Mn, mostrando que o Mn conseguiu mitigar a toxicidade de Cd em plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51.

Na imunodeteção houve maior acúmulo de catalase na presença de Cd e menor acúmulo na presença de Cd+Mn, demonstrando a mitigação do estresse oxidativo, induzido pela toxicidade de Cd, pelo Mn em plantas jovens do genótipo de cacau CCN 51.

Houve diferentes respostas de Mn na mitigação do efeito tóxico de Cd em plantas jovens de cacau, como o maior acúmulo de proteínas, indução de proteínas relacionadas a desintoxicação, dentre outros. Observou-se maior indução de proteínas que mitigaram o efeito tóxico do Cd nas raízes do que nas folhas.

## REFERÊNCIAS

- ABADA, L. R.; D'URZOA, M. P.; LIUA, D.; et al. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. **Plant Science**, v. 118, n. 1, p. 11–23, 1996.
- ABDIN, M. Z.; KIRAN, U.; ALAM, A. Analysis of osmotin, a PR protein as metabolic modulator in plants. **Bioinformation**, v. 22;5, n. 8, p. 336-340, 2011.
- AGRAWAL, G. K.; PEDRESCHI, R.; BARKLA, B. J.; BINDSCHEDLER, L. V.; CRAMER, R. SARKAR, A.; RENAUT, J.; JOB, D.; RAKWAL, R. Translational plant proteomics: a perspective. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 15, p. 4588-4601, 2012.
- AHSAN, N.; RENAUT, J.; KOMATSU, S. Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. **Proteomics**, Weinheim, v. 9, n. 10, p. 2602-2621, 2009.
- AJJIMAPORN, A.; BOTSFORD, T.; GARRETT, S. H.; SENS, M. A.; ZHOU, X. D.; DUNLEVY, J. R.; et al. ZIP8 expression in human proximal tubule cells, human urothelial cells transformed by Cd<sup>+2</sup> and As<sup>+3</sup> and in specimens of normal human urothelium and urothelial cancer. **Cancer Cell Int.** 12, 16. doi: 10.1186/1475-2867-12-16, 2012.
- AL-KEDHAIRY, A. A.; AL-ROKAYAR, S. A.; AL-MISUED, F. A. Cadmium toxicity on cells stress response. **Pakistan J. Biol.Sci.** v. 4, p.1046-1049, 2001.
- ALLEN, M. D.; KROPAT, J.; TOTTEY, S.; DEL CAMPO, J. A.; MERCHANT, S. S. Manganese deficiency in *Chlamydomonas* results in loss of photosystem II and MnSOD function, sensitivity to peroxides, and secondary phosphorus and iron deficiency. **Plant Physiol.** v. 143, p. 263–277, 2007.
- ALMEIDA, A-A. F.; VALLE, R. R. Ecophysiology of the cacao tree. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 425-448, 2007.
- ALMEIDA, A-A. F.; VALLE, R. R.; MIELKE, M. S.; GOMES, F. P. Tolerance and prospection of phytoremediator woody species of Cd, Pb, Cu and Cr. **Braz. J. Plant Physiol.** v. 19, p. 83-98, 2007.
- ALOUI, A.; RECORBET, G.; GOLLOTTE, A.; ROBERT, F.; VALOT, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; ASCHI-SMITI, S.; DUMAS-GAUDOT, E. On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: A root proteomic study. **Proteomics** v. 9, p. 420–433, 2009.
- ALVAREZ, S.; BERLA, B. M.; SHEFFIELD, J.; CAHOON, R. E.; JEZ, J. M.; HICKS, L. M. Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. **Proteomics**, v. 9, p. 2419–2431, 2009.
- AMUDHA, J.; BALASUBRAMANI, G. Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. **Biotechnol. Mol. Biol. Rev.** v. 6, n. 2, p. 31-58, 2011.
- ANDERSSON, F. I. et al. Structure and function of a novel type of ATP-dependent Clp protease. **J Biol Chem**, v.284, n.20, p.13519-32, 2009.

ANJUM, N. A.; SHARMA, P.; GILL, S. S. et al. Catalase and ascorbate peroxidase representative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifying heme enzymes in plants. **Environ Sci Pollut Res** v. 23, p. 19002-29, 2016.

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

ARAÚJO, D. M. S. **Perfil proteômico e estresse oxidativo em plantas jovens de cacau submetidas a doses de potássio e a seca no solo**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, 2017.

ARENA, C.; FIGLIOLI, F.; SORRENTINO, M.C.; IZZO, L.G.; CAPOZZI, F.; GIORDANO, S.; SPAGNUOLO, V. Ultrastructural, protein and photosynthetic alterations induced by Pb and Cd in *Cynara cardunculus* L., and its potential for phytoremediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 145, p. 83–89, 2017.

ARÉVALO-GARDINI, E.; ARÉVALO-HERNÁNDEZ, C. O.; BALIGAR, V. C.; HE, Z. L. Heavy metal accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. **Science of the Total Environment**, v. 605/606, 792-800, 2017.

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

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

BAKER, B.; TRACY, D. 2008. Elemental contaminants in fertilizers and soil amendments used in organic production. In: **Proceedings of the 16th IFOAM Organic World Congress**; 2008 Jun 16 – 20; Modena, Italy. BARROSO, J. P. **O Papel do Mn na Toxicidade de Cd em Plantas Jovens de Cacau: Respostas Fisiológicas, Bioquímicas, Moleculares, Micromorfológicas e Ultraestruturais**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2018.

BARTLEY, B. G. D. **The genetic diversity of cacao and its utilization**. CABI Publishing. Wallingford, UK. 341p. 2005.

BASSON, C. E.; GROENEWALD, J. H.; KOSSMANN, J.; CRONJE, C.; BAUER, R. Upregulation of pyrophosphate: fructose 6-phosphate1-phosphotransferase (PFP) activity in strawberry. **Transgenic Res** v. 20, p. 925–931, 2011.

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

BASZYNSKI, T., WAJDA, L., KROL, M., WOLINSKA, D., KRUPA, Z., TUKEN-DORF, A. Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. **Physiol. Plant.**, v. 48, p. 365–370, 1980.

BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 17, p. 21-34, 2005.

- BERNARD, A.; LAUWERYS, R. Cadmium in human population. **Experientia**, v. 40, p.143-152, 1984.
- BERTOLDE, F.Z.; ALMEIDA, A-A.F.; SILVA, F.A.C.; OLIVEIRA, T.M.; PIROVANI, C.P. Efficient method of protein extraction from *Theobroma cacao* L. roots for two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry analyses. **Genetics and Molecular Research**, v.13, n.3, p.5036–5047, 2014.
- BERTOLDI, D., BARBERO, A., CAMIN, F., CALIGIANI, A., LARCHER, R. Multielemental fingerprinting and geographic traceability of *Theobroma cacao* beans and cocoa products. **Food control**. v. 65, p. 46-53. 2016.
- BOUCHER, N.; CARPENTIER, R. Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Pb<sup>2+</sup>-induced changes in Photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes: a study using simultaneous fluorescence and photoacoustic measurements. **Photosynth. Res.** v. 59, p. 167–174, 1999.
- BOZA, E.J., MOTAMAYOR, J.C., AMORES, F.M., AMADOR, S.C., TONDO, C.L., LIVINGSTONE, D.S., SCHNELL, R.J. Genetic characterization of the cacao cultivar CCN 51: its impact and significance on global cacao improvement and production. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** v. 139, n. 2, p. 219–229, 2014.
- BROADLEY, M. et al. Function of nutrients: micronutrients. In Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Marschner, P., ed.), pp. 191–248, Academic Press. 2012.
- BURNELL, J.C. et al. The biochemistry of manganese in plants. In Manganese in Soil and Plants (Graham, R.D., ed.), pp. 125–137, **Kluwer Academic Publishers**. 1988.
- CALLAHAN, D. L.; BAKER, A. J. M.; KOLEV, S. D.; WEDD, A. G. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. **J. Biol. Inorg. Chem.** v. 11, p. 2-12, 2006.
- CAO, F.; CHEN, F.; SUN, H.; ZHANG, G.; CHEN, Z. H.; WU, F. Genome-wide transcriptome and functional analysis of two contrasting genotypes reveals key genes for cadmium tolerance in barley. **BMC Genomics**, v. 15, p. 611, 2014.
- CAO, F.; WANG, N.; ZHANG, M.; DAI, H.; DAWOOD, M.; ZHANG, G.; WU, F. Comparative study of alleviating effects of GSH, Se and Zn under combined contamination of cadmium and chromium in rice (*Oryza sativa*). **Biometals**, v. 26, p. 297-308, 2013.
- CAOBISCO/ECA/FCC. **Cocoa Beans: chocolate and cocoa industry quality requirements**. (End, M. J. e Dand, R., Editors), 2015.
- CARNEIRO, J. M. T.; CHACÓN-MADRID, K.; GALAZZI, R. M.; CAMPOS, B. K.; ARRUDA, S. C. C.; AZEVEDO, R. A.; ARRUDA, M. A. Z. Evaluation of silicon influence on the mitigation of cadmium-stress in the development of *Arabidopsis thaliana* through total metal content, proteomic and enzymatic approaches. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 44, p. 50–58, 2017.
- CATALDO, D. A.; GARLAND, T. R.; WILDUNG, R. E. Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. **Plant Physiol.**, v. 73, p. 844-848, 1983.
- CHAFFEI, C., et al. Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. **Plant Cell Physiol.**, v. 45, p. 1681-1693, 2004.

CHAKRAVARTY, B.; SRIVASTAVA, S. Toxicity of some heavy metals in vivo and in vitro in *Helianthus annuus*. **Mutation Research Letters**. v. 283, n. 4, p. 287-294, 1992.

CHAVEZ, E., HE, Z.L., STOFFELLA, P.J., MYLAVARAPUB, R.S., LI, Y.C., MOYANOD, B., BALIGAR, V.C. Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. **Sci. Total Environ**. v. 533, p. 205–214, 2015.

CHENG, Z-W; CHEN, Z-Y; YAN, X.; BIAN, Y-W; DENG, X.; YAN, Y-M. Integrated physiological and proteomic analysis reveals underlying response and defense mechanisms of *Brachypodium distachyon* seedling leaves under osmotic stress, cadmium and their combined stresses. **Journal of Proteomics** v. 170, p. 1–13, 2018.

CHO M.H., MOINUDDIN S.G., HELMS G.L., HISHIYAMA S., EICHINGER D., DAVIN L.B., LEWIS N.G. (+)-Larreatricin hydroxylase, an enantio-specific polyphenol oxidase from the creosote bush (*Larrea tridentata*). **PROC. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, p. 10641-6, 2003.

CHORA, S.; STARITA-GERIBALDI, M.; GUIGONIS, J.-M.; SAMSON, M.; BEBIANNO, M. J. Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. **Aquatic Toxicology**, v. 94, p. 300–308, 2009.

CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. **Cell**, v.79, n. 1, p.13 – 21, 1994.

CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**. v. 88, p. 1707–1719, 2006.

CLEMENS, S., MA, J.F. Toxic heavy metal and metalloids accumulation in crop plants and foods. **Annu. Rev. Plant Biol**. v. 67, p. 489–512, 2016.

CLIJSTERS, H.; VAN ASSCHE, F. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. **Photosynthesis Research**, v. 7, p. 31-40, 1985.

COBBETT, C. S.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**. v. 53, p.159-182, 2002.

COHEN, C. K., GARVIN, D. F., KOCHIAN, L. V. Kinetic properties of a micronutrient transporter from *Pisum sativum* indicate a primary function in Fe uptake from the soil. **Planta**, v. 218, p. 784–792, 2004.

CONAB, **Análise mensal de cacau (amêndoa)**. Disponível em: [https://www.conab.gov.br/...cacau/.../15209\\_f1224c18e2ec9b8e1b1c9a5796fe55d3](https://www.conab.gov.br/...cacau/.../15209_f1224c18e2ec9b8e1b1c9a5796fe55d3). Último acesso em: 15/10/2017.

CONAMA, **RESOLUÇÃO No 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005**. Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63

CONSTABEL, C. P.; BERGEY, D. R.; RYAN, C. A: Polyphenol oxidase as a component of the inducible defense response in tomato against herbivores. **In Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions**. Edited by: ROMEO, J. T.; SAUNDERS, J. A.; BARBOSA, P. Plenum Press, New York, 231-252, 1996.

- CONSTABEL, C. P.; RYAN, C. A. A survey of wound- and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plants. **Phytochemistry**. v. 47, p. 507-511, 1998.
- COSIO, C.; DESANTIS, L.; FREY, B.; DIALLO, S.; KELLER C. Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. **J. Exp. Bot.** v. 56, n. 412, p. 765-775, 2005.
- COX, J.; MANN, M. Is proteomics the new genomics? **Cell**, London, v. 130, n. 3, p. 395-398, 2007.
- CURTO, M.; CAMAFEITA, E. LOPEZ, J. A; MALDONADO, A. M. RUBIALES, D.; JORRÍN, J. V. A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*). **Proteomics**, v. 3, p. 163 – 174, 2006.
- CUYPERS, A.; SMEETS, K.; RUYTINX, J.; OPDENAKKER, K.; KEUNEN, E.; REMANS, T.; HOREMANS, N.; VANHOUDT, N.; VAN SANDEN, S.; VAN BELLEGHEM, F.; et al. The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **J. Plant Physiol.** v. 168, p. 309–316, 2011.
- DALCORSO, G., et al. How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. **J. Integr. Plant Biol.** v. 50, p. 1268-1280, 2008.
- DALCORSO, G.; FARINATI, S.; FURINI, A. Regulatory networks of cadmium stress in plants. **Plant Sign. Behavior**. v. 5, n. 6, p. 663-667, 2010.
- D'ALESSANDRO, A.; TAAMALLI, M.; GEVI, F.; TIMPERIO, A. M.; ZOLLA, L.; GHNAYA, T. Cadmium stress responses in *Brassica juncea*: hints from proteomics and metabolomics. **J. Proteome Res.** v. 12, n. 11, p. 4979-97, 2013.
- DANTAS, L. G.; GUERRA, M. Chromatin differentiation between *Theobroma cacao* L. and *T. grandiflorum* Schum. **Gen. Mol. Biol.**; v. 33, p. 94-98, 2010.
- DANTAS, P. A. S. **Relação entre fertilidade do solo e nutrição do cacauero no sul da Bahia**. 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Solos e nutrição de plantas em ambiente tropical úmido) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2011.
- DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R. Studies on cadmium toxicity in plants: A review. **Environ. Pollut.** v. 98, n. 1, p. 29-36, 1997.
- DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. An historical perspective on lignan biosynthesis: Monolignol, allylphenol and hydroxycinnamic acid coupling and downstream metabolism. **Phytochemistry Reviews** v. 2, p. 257, 2003.
- DAYMOND, A. J., HADLEY, P., NG, E. Genetic variability in partitioning to the yield component of cacao (*Theobroma cacao* L.). **HortScience** v. 37, n. 5, p. 799–801, 2002.
- DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. Micronutrientes. In: FERNADES, M.S., ed. Nutrição mineral de plantas. Viçosa, MG, **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p.328-352, 2006.
- DICKINSON, N. M.; PULFORD, I. D. Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. **Environ. Int.** v. 31, p. 609-613, 2005.
- DONG, J.; WU, F.; ZHANG, G. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). **Chemosphere**, Oxford, v. 64, n. 10, p. 1659-1666, 2006.

DONG, L.; ZHANG, D.; FAN, S.; JIANG, L. et al. Overexpression of Soybean Isoflavone Reductase (GmIFR) Enhances Resistance to *Phytophthora sojae* in Soybean. **Front Plant Sci.** v. 6, p. 1024, 2015.

DORION, S.; PARVEEN; JEUKENS, J.; MATTON, D. P.; RIVOAL, J. Cloning and characterization of a cytosolic isoform of triosephosphate isomerase developmentally regulated in potato leaves. **Plant Sci**, v. 168, p. 183–194, 2005.

DUCIC, T., POLLE, A. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 17, p. 103-112, 2005.

DURAND, T.C; SERGEANT, K.; PLANCHON, S.; CARPIN, S.; LABEL, P.; MORABITO, D.; HAUSMAN, J.-F.; RENAUT, J. Acute metal stress in *Populus tremula* x *P. alba* (7171B4 genotype): leaf and cambial proteome changes induced by cadmium 2+. **Proteomics**, Weinheim, v. 10, n. 3, p. 349-468, 2010.

ECKMEKÇI, Y.; TANYOLAÇ, D.; AYHAN, B. Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. **Plant Physiol.** v. 165, p. 600–611, 2008.

FAGIONI, M.; D'AMICI, G. M.; TIMPERIO, A. M.; ZOLLA, L. Proteomic Analysis of Multiprotein Complexes in the Thylakoid Membrane upon Cadmium Treatment. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 310–326, 2009.

FAN, J.; ZHANG, Y.-Q.; LI, P.; HOU, M.; TAN, L.; WANG, X.; ZHU, Y.-S. Interaction of Plasminogen Activator Inhibitor-2 and Proteasome Subunit, Beta Type 1. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 36, n. 1, p. 42–46, 2004.

FRANCO, M. R. **Análise proteômica de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) em resposta ao cádmio.** 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

FÜHRS, H.; HARTWIG, M.; MOLINA, L.; HEINTZ, D.; VAN DORSSELAER, A.; BRAUN, H. et al. Early manganese-toxicity response in *Vigna unguiculata* L. - a proteomic and transcriptomic study. **Proteomics**, v. 8, p.149-59, 2008.

GALLEGO, S. M. et al. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, v. 83, p. 33-46, 2012.

GARNIER, L.; SIMON-PLAS, F.; THULEAU, P.; AGNEL, J. P.; BLEIN, J. P.; RANJEVA, R.; MONTILLET, J. L. Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. **Plant Cell Environ.** v. 29, p. 1956-1969, 2006.

GASIC, K., KORBAN, S. S., IN: MADHAVA RAO, K. M., RAGHAVENRA, A. S., JANARDHAN REDDY, K. (Eds.), Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants, **Springer**, Heidelberg, Germany, p. 219–254, 2006.

GE, C.-L.; WANG Z.-G; WAN, D.-Z; DING, Y.; WANG, Y.-L.; SHANG, Q.; LUO, S.-S. Proteomic Study for Responses to Cadmium Stress in Rice Seedlings. **Rice Science**, v. 16, n. 1. P. 33-44, 2009.

GILL, S. S.; TUTEJA N. Cadmium stress tolerance in crop plants. Probing the role of sulphur. **Plant Signal Behav.** v. 6, p. 1-8, 2011.

GILLET, S.; DECOTTIGNIES, P.; CHARDONNET, S. Cadmium response and redoxin targets in *Chlamydomonas reinhardtii*: a proteomic approach. **Photosynth Res** v. 89, p. 201–211, 2006.



GOUSSIAS, C., BOUSSAC, A., RUTHERFORD, A. W. Photosystem II and photosynthetic oxidation of water: an overview. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* v. 357, p. 1369–1381, 2002.

GRANT, G. A. D-3-Phosphoglycerate Dehydrogenase. *Front Mol Biosci.* v. 5, p. 110, 2018.

GRATÃO, P. L., MONTEIRO, C. C., ANTUNES, A. M., PERES, L. E. P., AZEVEDO, R. A. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. *Ann. Appl. Biol.* v. 153, p. 321–333, 2008.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metals-stressed plant a little easier. *Funct. Plant Biol.* v. 32, p. 481-494, 2005a.

GRATÃO, P. L.; PRASAD, M. N. V.; CARDOSO, P. F.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Phytoremediation: green technology for the cleanup of toxic metals in the environment. *Braz. J. Plant Physiol.* v. 17, n. 1, p. 53-64, 2005b.

GUELFY, A.; AZEVEDO, R. A.; LEA, P. J.; MOLINA, S. M. G. Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 49, n. 2, p. 63-73, 2003.

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

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

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

HALL, J. L. Cellular mechanisms for metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* v. 53, p.1-11, 2002.

HANSSON, D.; STOLT, P.; ASP, H.; MERKU, A. Rye cromossome with Cd regulating genes im wheat. In: **8<sup>th</sup> International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements**. Austrália, 2005. CD-ROM

HEBBERN, C. A., LAURSEN, K. H., LADEGAARD, A. H., SCHMIDT, S. B., PEDAS, P., BRUHN, D., et al. Latent manganese deficiency increases transpiration in barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plant.* v. 135, p. 307–316, 2009.

HENKES, S.; SONNEWALD, U.; BADUR, R.; FLACHMANN, R.; STITT, M. A Small Decrease of Plastid Transketolase Activity in Antisense Tobacco Transformants Has Dramatic Effects on Photosynthesis and Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell.* v. 13, p. 535–51, 2001.

- HERNÁNDEZ, L. E., CARPENA-RUIZ, R., GÁRATE, A. Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. **J. Plant Nutr.**, v. 19, p. 1581-1598, 1996.
- HILT, W.; WOLF, D. H. Proteasomes: Destruction as a programmol/Le. **Trends Biochem Sci**, v. 21, n. 3, p. 96 – 102, 1996.
- HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 7, n. 2, p. 215 – 223, 1995.
- HOMBLÉ, F.; KMITA, H.; SAIDANI, H.; LÉONETTI, M. Plant VDAC Permeability: Molecular Basis and Role in Oxidative Stress. In: Rostovtseva T. (eds) *Molecular Basis for Mitochondrial Signaling. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering*. Springer, Cham, 2017.
- HOSSAIN, Z.; MAKINO, T.; KOMATSU S. Proteomic study of  $\beta$ -aminobutyric acid-mediated cadmium stress alleviation in soybean. **Journal of Proteomics**. v. 75, n. 13, p. 4151-4164, 2012.
- HOSSAIN, Z.; HAJIKA, M.; KOMATSU, S. Comparative proteome analysis of high and low cadmium accumulating soybeans under cadmium stress. **Amino Acids**, v. 43, p. 2393–2416, 2012.
- HRADILOVA, J.; REHULKA, P.; REHULKOVÁ, H.; VRBOVÁ, M.; GRIGA, M.; BRZOBOHATÝ, B. Comparative analysis of proteomic changes in contrasting flax cultivars upon cadmium exposure. **Electrophoresis**, v. 31, p. 421–431, 2010.
- HUAMANI, H., HUAUYA, M.A., MANSILLA, L., FLORIDA, N., NEIRA, G. Presence of heavy metals in organic cacao (*Theobroma cacao* L.) crops. **Acta Agron**. v. 61, p. 309-314, 2012.
- HUSAINI, A. M.; ABDIN, M. Z. Overexpression of tobacco osmotin gene leads to salt stress tolerance in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) plants. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 4, 2008.
- IANNONE, M. F., et al. Reactive oxygen species formation and cell death in catalase-deficient tobacco leaf disks exposed to cadmium. **Protoplasma**, v. 245, p. 15-27, 2010.
- ICCO – **Organização Internacional do Cacau**. Disponível em: <https://www.icco.org/> . Último acesso em: 15/10/2017.
- IL'YASOVA, D.; SCHWARTZ, G. G. Cadmium and renal cancer. **Toxic. Appl. Pharm**. v. 207, p.179-186, 2005.
- JALIL, A., SELLES, F., CLARKE, J. M. Effect of cadmium on growth and the uptake of cadmium and other elements by durum wheat. **J. Plant Nutr.**, v. 17, p. 1839–1858, 1994.
- JÄRUP, L.; ALFVÉN, T. Low level cadmium exposure, renal and bone effects - the OSCAR study. **BioMetals**. v. 17, p. 505-509, 2004.
- JARVIS, S. C., JONES, L. H. P., HOPPER, M. J. Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots to shoots. **Plant and Soil**, v. 44, p. 179-191, 1976.
- JIAO, W., CHEN, W., CHANG, A.C., PAGE, A.L. Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: a review. **Environ. Pollut**. v. 168, p. 44–53, 2012.

- JÚNIOR, C. A. L.; BARBOSA, H. S.; GALAZZI, R. M.; KOOLEN, H. H. F.; GOZZO, F. C.; ARRUDA, M. A. Z. Evaluation of proteome alterations induced by cadmium stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 119, p. 170-177, 2015.
- KESSELER, A.; BRAND, M. D. The mechanism of the stimulation of state-4 respiration by cadmium in potato-tuber (*Solanum tuberosum*) mitochondria. **Plant Physiol. Biochem.** v. 33, p. 519-528, 1995.
- KIEFFER, P.; DOMMES, J.; HOFFMANN, L.; HAUSMAN, J-F; RENAUT, J. Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. **Proteomics**, v. 8, p. 2514–2530, 2008.
- KIEFFER, P.; SCHRODER, J.; DOMMES, J.; HOFFMANN, L.; RENAUT, J.; HAUSMAN, J-F. Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. **Journal of proteomics**, v. 72, p. 379– 396, 2009.
- KIEFFER, P.; SCHRÖDER, P.; DOMMES, J.; HOFFMANN, L.; RENAUT, J.; HAUSMAN, J-F. Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. **J. Proteomics**, v. 72, n. 3, p. 379-396, 2009.
- KIM, S. G. et al. Overexpression of rice isoflavone reductase-like gene (OsIRL) confers tolerance to reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum**, v. 138, n. 1, p. 1-9, 2010.
- KIM, S. G. et al. Proteomic analysis of reactive oxygen species (ROS)-related proteins in rice roots. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 2, p. 363–375, 2008.
- KIM, S. T. et al. A rice isoflavone reductase-like gene, OsIRL, is induced by rice blast fungal elicitor. **Molecular Cells**, v. 16, n. 2, p. 224-231, 2003.
- KIRKHAM, M. B. Cadmium in plants on polluted soils: effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. **Geoderma**. v. 137, p. 19-32, 2006.
- KOMATSU, S.; HOSSAIN, Z. Organ-specific proteome analysis for identification of abiotic stress response mechanism in crop. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 71, 2013.
- KONNO, H. et al. The regulator of the F1 motor: inhibition of rotation of cyanobacterial F1-ATPase by the subunit. **The EMBO Journal**, v. 25, p. 4596-4604, 2006.
- KOSOVÁ, K.; VÍTÁMVÁS, P.; PRÁŠIL, I.T.; RENAUT, JENNY. Plant proteome changes under abiotic stress-contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 8, p. 1301-1322, 2011.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L. AND BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiological reviews**. v. 87, p. 99-163, 2007.
- KUO, W.Y.; HUANG, C.H.; LIU, A.C.; CHENG, C.P.; LI, S.H.; CHANG, W.C. et al., Chaperonin 20 mediates iron superoxide dismutase (FeSOD) activity independent of its cochaperonin role in Arabidopsis chloroplasts, **New Phytol.** v. 197, p. 99–110, 2013.
- KÜPPER, H., PARAMESWARAN, A., LEITENMAIER, B., TRTÍLEK, M.; SETLÍK, I. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **New Phytol.** v. 175, p. 655–674, 2007.

- KÜPPER, H.; ŠETLÍK, I.; SPILLER, M.; KÜPPER, F.C.; PRÁŠIL, O. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. **J. Phycol.** v. 38, p. 429–441, 2002.
- KUREPA J.; TOH-E, A.; SMALLE, J. A. 26S proteasome regulatory particle mutants have increased oxidative stress tolerance. **Plant J.** v. 53, n.1, p.102-14, 2008.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685. 1970.
- LAGRIFFOUL, A.; MOCQUOT, B.; MENCH, M.; VANGRONSVELD, J. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). **Plant Soil.** v. 200, p. 241-250, 1998.
- LARCHER W. Physiological plant ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. Ed 4. Berlin, Heidelberg: **Springer Verlag**; v. 2003. p. 513, 1929.
- LARSEN, C. N.; FINLEY, D. Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 431 – 434, 1997.
- LASAT, M. M. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. **Journal of Environmental Quality**, v.31, p.109-120, 2002.
- LASPINA, N. V.; GROPPA, M. D.; TOMARO, M. L.; BENAVIDES, M. P. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. **Plant Sci.** v. 169, p. 323-330, 2005.
- LE BOT, J., KIRBY, E. A., VAN BEUSUCHEM, M. L. Manganese toxicity in tomato plants: effects on cation uptake and distribution. **J. Plant Nutr.** v. 13, p. 513–525, 1990.
- LECHNER, E. et al. F-box proteins everywhere. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 8-631, 2006.
- LEE, K.; BAE, D.W.; KIM, S.H.; HAN, H.J.; LIU, X.; PARK, H.C.; LIM, C.O.; LEE, S.Y.; CHUNG, W.S. Comparative proteomic analysis of the short-term responses of rice roots and leaves to cadmium. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, n. 3, p. 161-168, 2010.
- LESS, H.; ANGELOVICI, R.; TZIN, V.; GALILI, G. Coordinated gene networks regulating Arabidopsis plant metabolism in response to various stresses and nutritional cues. **Plant Cell** [Internet]. v. 23, n. 4, p. 1264–71, 2011.
- LIM, H.; CHO, M. H.; BHOO, S. H.; HAHN, T. R. Pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase is involved in the tolerance of Arabidopsis seedlings to salt and osmotic stresses. **In Vitro Cell Dev Biol Plant** v. 50, p. 84–91, 2013.
- LIM, H.; CHO, M. H.; JEON, J. S.; BHOO, S. H.; KWON, Y. K.; HAHN, T. R. Altered expression of pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase affects the growth of transgenic Arabidopsis plants. **Mol Cells.** v. 27, n. 6, p. 641-9, 2009.
- LIN, C. C.; LIN, H. L. Remediation of soil contaminated with the heavy metal (Cd<sup>+2</sup>). **J. Hazardous Materials.** v. 122, p. 7-15, 2005.

LIN, Y-F.; AARTS, M. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 69, n. 19, p. 3187-3206, 2012.

LIU, J. G.; LIANG, J. S.; LI, K. Q.; ZHANG, Z. J.; YU, B. Y.; LU, X. L.; et al. Correlations between cadmium and mineral nutrients in absorption and accumulation in various genotypes of rice under cadmium stress. **Chemosphere** v. 52, p. 1467–1473, 2003.

LIU, X. L.; BAI, J.; HUANG, L.; ZHU, L.; LIU, X.; WENG, N.; REESE, J. C.; HARRIS, M.; STUART, J. J.; CHEN, M. S. Gene expression of different wheat genotypes during attack by virulent and avirulent Hessian fly (*Mayetiola destructor*) larvae. **J Chem Ecol**, v. 33, p. 2171–2194, 2007.

MA, M.; LAU, P-S.; JIA, Y-T.; TSANG, W-K.; LAM, S. K. S.; TAM, N. F. Y.; WONG, Y-S. The isolation and characterization of Type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant. *Festuca rubra* cv. Merlin. **Plant Sci.** v. 164, p. 51-6, 2003.

MACFARLANE, G. R.; BURCHETT, M. D. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the Grey Mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. **Marine Poll. Bull.** v. 48, n. 3, p. 233-240, 2001.

MAERE, S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. **Bioinformatics.** v. 21, n. 16, p. 3448–9, 2005. MARMIROLI, M.; IMPERIALE, D.; MAESTRI, E.; MARMIROLI, N. The response of *Populus* spp. to cadmium stress: Chemical, morphological and proteomics study. **Chemosphere**, v. 93, n. 7, p. 1333-1344, 2013.

MARSCHNER, P. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Boston, MA: **Academic Press**. 2012.

MAYER, A.; LILL, R.; NEUPERT, W. Translocation and insertion of precursor proteins into isolated outer membranes of mitochondria. **J Cell Biol.** v. 121, p. 1233-1243, 1993.

MHAMDI, A.; MAUVE, C.; GOUIA, H.; SAINDRENAN, P.; HODGES, M.; NOCTOR, G. Cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase contributes to redox homeostasis and the regulation of pathogen responses in Arabidopsis leaves. **Plant, Cell & Environment** v. 33, p. 1112–1123, 2010.

MOBIN, M.; KHAN, N. A. 2007. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. **J. Plant Physiol.** v.164, p. 601-610, 2007.

MOEDER, W.; DEL POZO, O.; NAVARRE, D. A.; MARTIN, G. B.; KLESSIG, D. F. Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in Arabidopsis and *Nicotiana benthamiana*. **Plant Molecular Biology** v. 63, p. 273–287, 2007.

MOGHADAM, A. A.; TAGHAVI, S. M.; NIAZI, A.; DJAVAHERI, M.; EBRAHIMIE, E. Isolation and insilico functional analysis of MtATP6, a 6-kDa subunit of mitochondrial F1F0-ATP synthase, in response to abiotic stress. **Genet Mol Res** v. 4, p. 3547–67, 2012.

- MOHAMED, M.; NAHEIF, E. Behaviour of wheat Cv. Masr-1 plants to foliar application of some vitamins. **Nature & Sci.**, v. 11, n. 6, p. 1, 2013.
- MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; ANDREY, D.; BLAKE, C.; LOBINSKI, R. Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. **Food Addit. Contam.** v. 20, p. 343–352, 2003.
- MUKHOPADHYAY M.; SHARMA, A. Manganese in cell metabolism of higher plants. **Bot. Rev.**, v. 57, p. 117-149, 1991.
- NAGAJYOTI, P.C.; LEE, K.D.; SREEKANTH, T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, Secaucus, v. 8, n. 3, p. 199-216, 2010.
- NAGALAKSHMI, N.; PRASAD, M. N. V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. **Plant Sci.** v. 160, p. 291-299, 2001.
- NASCIMENTO, S. V.; MAGALHÃES, M. M.; CUNHA, R. L.; COSTA, P. H. O.; ALVES, R. C. O.; OLIVEIRA, G. C.; VALADARES, R. B. S. Differential accumulation of proteins in oil palms affected by fatal yellowing disease. **PLoS ONE** v. 13, n. 4, e0195538. 2018.
- NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. **Lehninger: Principles of Biochemistry**, 5th Edition, W. H. Freeman, New York. 2009.
- NEUHOFF, V. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255-262. 1988.
- NEUMANN, D.; LICHTENBERGER, O.; GÜNTHER, D.; TSCHIRSCH, K.; NOVER, L. Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. **Planta** v.146, p. 704-717, 1994.
- NICHOLSON, F.A; SMITH, S.R.; ALLOWAY, B.J.; CARLTON-SMITH, C.; CHAMBERS, B.J. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. **The Science of the total environment**, Amsterdam, v. 311, n. 1/3, p. 205-219, 2003.
- NICKELSEN, J.; RENGSTL, B. Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 64, p. 609–635, 2013.
- NOCITO, F. F.; LANCILLI, C.; CREMA, B.; FOURCROY, P. et al., Heavy metal stress and sulfate uptake in maize roots. **Plant Physiol.** v. 141, p. 1138–1148, 2006.
- NOCTOR, G.; QUEVAL, G.; MHAMDI, A.; CHAOUCH, S.; FOYER, C. H. Glutathione. **The Arabidopsis Book**. v. 9, p. 1-42, 2011.
- PAL'OVE-BALANG, P., KISOVÁ, A., PAVLOVKIN, J., MISTRÍK, I. Effect of manganese on cadmium toxicity in maize seedlings. **Plant Soil Environmental**, v. 52, p. 143-149, 2006.
- PAQUIS, S. et al. Characterization of a F-box gene up-regulated by phytohormones and upon biotic and abiotic stresses in grapevine. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 3327-37, 2011.

- PATRA, M. et al. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environ. Exp Botany**, v.52, p.199-223, 2004.
- PENA, L. B.; PASQUINI, L. A.; TOMARO, M. L.; GALLEGRO, S. M. 20S proteasome and accumulation of oxidized and ubiquitinated proteins in maize leaves subjected to cadmium stress. **Phytochem.** v. 68, p. 1139-1146, 2007.
- PENDIAS, K.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. USA, CRR Press, 365 p. 1992.
- PENG, K., et al. Manganese uptake and interactions with cadmium in the hyperaccumulator—*Phytolacca Americana* L. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, p. 674–681. 2008.
- PERFUS-BARBEOCH, L.; LEONHARDT, N.; VAVASSEUR, A.; FORESTIER, C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. **Plant J.** v. 32, n. 4, p. 539-548, 2002.
- PIETRINI, F.; ZACCHINI, M.; IORI, V.; PIETROSANTI, L.; FERRETTI, M.; MASSACCI, A. Spatial distribution of cadmium in leaves and its impact on photosynthesis: examples of different strategies in willow and poplar clones. **Plant Biol.** v. 12, n. 2, p. 355-363, 2010.
- PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 56, p. 15-39, 2005.
- PINTO, A. P., et al. Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. **Sci. Tot. Environ**, v. 326, p. 239-247, 2004.
- PINTO, F. C. **Fertilidade do solo e partição de nutrientes em cacauzeiros**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2013.
- PIROVANI, C. P., et al. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. **Electrophoresis**, 29, 2391–2401, 2008.
- PRASAD, M. N. V.; FREITAS, H. M. O. Metal hyperaccumulation in plants – Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. **Electronic J. Biotech.** v. 6, n. 3, p. 285-321, 2003.
- PRASAD, M. N. V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environ. Exp. Bot.** v. 35, n. 4, p. 525-545, 1995.
- QIAN, H.; LI, J.; PAN, X.; JIANG, H.; SUN, L.; FU Z. Photoperiod and temperature influence cadmium's effects on photosynthesis-related gene transcription in *Chlorella vulgaris*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 73, p. 1202-1206, 2010.
- RAHOUI, S.; CHAOUI, A.; EL FERJANI, E. Differential sensitivity to cadmium in germinating seeds of three cultivars of faba bean (*Vicia faba* L.). **Acta Physiol. Plant.** v. 30, n. 4, p. 451-456, 2008.
- RAHOUI, S.; CHAOUI, A.; EL FERJANI, E. Membrane damage and solute leakage from germinating pea seed under cadmium stress. **J. Hazar. Mater.** v. 178, p. 1128-1131, 2010.

RAMOS, I., ESTEBAN, E., LUCENA, J. J., GÁRATE, A. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd–Mn interaction, **Plant Sci.**, v. 162, p. 761–767, 2002.

RAO, J.; LV, W.; YANG, J. Proteomic analysis of saffron (*Crocus sativus* L.) grown under conditions of cadmium toxicity. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 33, n. 3, p. 713-720, 2017.

REDDY, G. N; PRASAD, M. Tyrosine is not phosphorylated in cadmium induced hsp70 cognate in maize (*Zea mays* L.) seedlings: Role in chaperone function. **Biochemical archives**, v. 9, p. 25-32, 1993.

RIVETTA, A.; NEGRINI, N.; COCUCCI, M. Involvement of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin in Cd<sup>2+</sup> toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. **Plant Cell Environ.** v. 20, p. 600-608, 1997.

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

RODRÍGUEZ-SERRANO, M., et al. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. **Plant Physiol.**; v. 150, p. 229-243, 2009.

ROJAS, C. M.; SENTHIL-KUMAR, M.; TZIN, V.; MYSORE, K. S. Regulation of primary plant metabolism during plantpathogen interactions and its contribution to plant defense. **Front Plant Sci** v. 5, p. 17, 2014.

ROMERO-PUERTAS, M, C.; RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; CORPAS, F. J.; GÓMEZ, M.; DEL RÍO, L. A.; SANDALIO, L. M. Cd-induced subcellular accumulation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea leaves. **Plant Cell Environ.** v. 27, p. 1122-1134, 2004.

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

ROTH, U., VON ROEPENACK-LAHAYE, E., CLEMENS, S., Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd<sup>2+</sup>. **J. Exp. Bot.** v. 57, p. 4003–4013, 2006.

SANITÀ DI TOPPI, L.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environ. Exp. Bot.** v. 41, n. 2, p. 105-130. 1999.

SARRY, J.E.; KUHN, L.; DUCRUIX, C.; LAFAYE, A.; JUNOT, C.; HUGOUVIEUX, V. et al., The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses, **Proteomics**, v. 6, p. 2180–2198, 2006.

SATARUG, S.; BAKER, J.R.; URBENJAPOL, S.; ELKINS, M. H.; REILLY, P. E. B.; WILLIAMS, D. J.; MOORE, M. R. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. **Toxicol. Letters**, v. 137, p. 65-83, 2003.

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



SCHEIDELER, M.; SCHLAICH, N.L.; FELLEBERG, K.; BEISSBARTH, T.; HAUSER, N. C.; VINGRON, M. et al. Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. **J Biol Chem.** v. 277, n. 12, p. 10555–61, 2002.

SCHMIDT, S. B., et al. Latent manganese deficiency in barley can be diagnosed and remediated on the basis of chlorophyll a fluorescence measurements. **Plant Soil**, v. 372, p. 417–429, 2013.

SCHMIDT, S.B. et al. Manganese deficiency in plants: the impact on photosystem II. **Trends Plant Sci.** v. 21, p. 622–632, 2016.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **J. Exp. Bot.** v. 53, n. 372, p.1351-1365, 2002;

SEREGIN, I. V.; IVANOV, V. B. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. **Russ. J. Plant Physiol.** v. 48, p. 523–544, 2001.

SHAH, K.; KUMAR, R. G.; VERMA, S.; DUBEY, R. S. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Sci.** v. 161, p. 1135-1144, 2001.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D. et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research.** v. 13, n. 11, p. 2498–504, 2003.

SHOJI, T. et al. Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco. **Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 427-440, 2002.

SMIRI M., et al. Cadmium induced mitochondrial redox changes in germinating pea seed. **Biomaterials**, v. 23, p. 973-984, 2010.

SMITH, A. G.; CROFT, M. T.; MOULIN, M.; WEBB, M.E. Plants need their vitamins too. **Physiol. Metab.**, v. 10, n. 3, p. 266-275, 2007.

SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O.; CARVALHO, J. G.; MOREIRA, F. M. S. Fitotoxidez de cádmio para *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* em solução nutritiva. **Rev. Árvore** v. 29, p.175-183, 2005.

SOBKOWIAK, R.; DECKERT, J. Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean. **Plant Physiol. Biochem.** v. 41, p. 767-772, 2003.

SOUZA JÚNIOR, J. O. **Fatores edafoclimáticos que influenciam a produtividade do cacaueteiro cultivado no Sul da Bahia.** 1999. 146 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

SOUZA, V. L., et al. Morphophysiological responses and programmed cell death induced by cadmium in *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Biomaterials**, v. 24, p. 59-71, 2011.

SOUZA, V. L.; SILVA, D. C.; SANTANA, K. B.; MIELKE, M. S.; ALMEIDA, A-A. F.; MANGABEIRA, P. A. O.; ROCHA, E. A. Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. **Acta Bot. Bras.** v. 23, p. 343-354, 2009.

- SPARKS, D. Environmental Soil Chemistry. San Diego, **Academic Press**, 352 p. 1995.
- SPEISER, D. M.; ABRAHAMSON, S. L.; BANUELOS, G.; OW, D. W. Brassica juncea produces a phytochelatin-cadmium-sulfide complex. **Plant Physiol.** v. 99, p. 817–821, 1992.
- SULLIVAN, M. L. Beyond brown: polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. **Front. Plant Sci.**, v. 5, p. 783, 2015.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Ed. 6. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 719
- TANYOLAÇ, D.; EKMEKÇI, Y.; ÜNALAN, Ş. Changes in photochemical and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper. **Chemosphere**, v. 67, p. 89–98, 2007.
- THIPYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. **Phytochemistry**, v. 40, p. 673-676, 1995.
- THOMINE, S., LELIÈVRE, F., DEBARBIEUX, E., SCHROEDER, J. I., BARBIER-BRYGOO, H. AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. **Plant J.**, v. 34, n. 5, p. 685-695, 2003.
- TRAN, T. A.; POPOVA, L. P. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. **Turk. J. Bot.** v. 37, p. 1–13, 2013.
- VAN BELLEGHEM, F.; CUYPERS, A.; SEMANE, B.; SMEETS, K.; VANGRONSVELD, J.; D'HAEN, J.; VALCKE, R. Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. **New Phytol.** v. 17, p. 495-508, 2007.
- VASSILEV, A.; VANGRONSVELD, J.; YORDANOV, I. Cadmium phytoextraction: present state, biological backgrounds and research needs. **Bulgarian J. Plant Physiol.** v. 28, n. 3-4, p. 68-95, 2002.
- VASSILEV, A.; YORDANOV, I. Reductive analysis of factors limiting growth of cadmium-treated plants: a review. **Bulg. J. Plant physiol.**, v. 23, p. 114–133, 1997.
- VÁZQUEZ, S.; GOLDSBROUGH, P.; CARPENA, R. O. Assessing the relative contributions of phytochelatins and the cell wall to cadmium resistance in white lupin. **Physiol. Plant.** v. 128, p. 487-495, 2006.
- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.** v. 12, p. 364-372, 2009.
- VESCOVI, M.; ZAFFAGNINI, M.; FESTA, M.; TROST, P.; LO SCHIAVO, F.; COSTA, A. Nuclear accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cadmium-stressed *Arabidopsis* roots. **Plant Physiology**, v. 162, p. 333-346, 2013.
- VILLIERS, F.; DUCRUIX, C.; HUGOUVIEUX, V.; JARNO, N.; EZAN, E.; GARIN, J.; JUNOT, C.; BOURGUIGNON, J. Investigating the plant response to cadmium

exposure by proteomic and metabolomic approaches. **Proteomics**, v. 11, p. 1650–1663, 2011.

VISIOLI, G.; MARMIROLI, M.; MARMIROLI, N. Two-dimensional liquid chromatography (2D-LC) technique coupled with mass spectrometry analysis to compare the proteomic response to cadmium stress in plants. **J. Biomed. Biotechnol.** v. 2010, p.1-10, 2010.

VITÓRIA, A. P. et. al. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, v.57, p.701- 710, 2001.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**, 4th Edition, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2011.

WAGNER, G. J. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. **Adv. Agron.** v. 51, p. 173-212, 1993.

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**, v. 334, p.1081–1086, 2011.

WARREN, M.J.; RAUX, E.; SCHUBERT, H.L.; ESCALANTE-SEMERENA, J.C. 2002. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B12). **Nat Prod Rep**, v. 19, p. 390-412, 2002.

WHITE P. J.; GREENWOOD, D.J. Properties and management of cationic elements for crop growth. In: Gregory PJ, Nortcliff S (eds) **Soil Conditions and Plant Growth**. Blackwell Publishing, Oxford, pp 160–194, 2013.

WOLUCKA, B. A.; VAN MONTAGU, M. GDP-mannose 30,50-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 47483–47490, 2003.

WU, F.; ZHANG, G.; YU, J. Interaction of cadmium and four microelements for uptake and translocation in different barley genotypes, **Commun. Soil Sci. Plant Anal.** v. 34, p. 2003-2020, 2003.

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

YAMAGUCHI, M. et al. Regulation of growth response to water stress in the soybean primary root. I. Proteomic analysis reveals region-specific regulation of phenylpropanoid metabolism and control of free iron in the elongation zone. **Plant Cell and Environment**, v. 33, p. 223-243, 2010.

YANG, M. G., LIN, X. Y., YANG, X. E. Impact of cadmium on growth and nutrient accumulation of different plant species. **Chin. J. Appl. Ecol.**, v. 9, p. 89–94, 1998.

YANG, X.; FENG, Y.; HE, Z.; STOFFELLA, P. J. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation, **J. Trace Elem. Med. Biol.** v. 18, p. 339-353, 2005.

- YOU, X., YANG, L.T., LU, Y.B. et al. Proteomic changes of *Citrus* roots in response to long-term manganese toxicity. **Trees** v. 28, p. 1383, 2014.
- YOUNG, M. J.; BAY, D. C.; HAUSNER, G.; COURT, D. A. The evolutionary history of mitochondrial porins. **BMC Evolutionary Biology** v. 7, p. 31, 2007.
- ZACCHINI, M.; PIETRINI, F.; SCARASCIA MUGNOZZA, G.; IORI, V.; PIETROSANTI, L.; MASSACCI, A. Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. **Water Air Soil Poll.** v. 197, n. 1, p. 23-34, 2009.
- ZHANG, F., et al. Response of oxidative enzymes in cucumber chloroplasts to cadmium toxicity, **J. Plant Nutr.** v. 26, p. 1779–1788, 2003.
- ZHANG, S.; ZHANG, L.; ZHOU, K.; LI, Y.; ZHAO, Z. Changes in protein profile of *Platycladus orientalis* (L.) roots and leaves in response to drought stress. **Tree Genetics & Genomes** v. 13, p. 76, 2017.
- ZHANG, W.; RUAN, J.; HO, T-H. D.; YOU, Y.; YU, T.; QUATRANO, R. S. Cis-regulatory element based targeted gene finding: genome-wide identification of abscisic acid- and abiotic stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. **Bioinformatics** v. 21, n. 14, p. 3074-3081, 2005.
- ZHANG, X.; LI, C.; NAN, Z. Effects of cadmium stress on growth and anti-oxidative systems in *Achnatherum inebrians* symbiotic with *Neotyphodium gansuense*. **J. Haz. Mat** v. 175, n. 1-3, p. 703-709, 2010.
- ZHANG, W.; ZHANG, M.; GAO, C.; ZHANG, Y.; GE, Y.; GUO, S.; GUO, X.; ZHOU, Z.; LIU, Q.; ZHANG, Y.; MA, C.; TAO, F.; XU, P. Coupling between D-3-phosphoglycerate dehydrogenase and D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase drives bacterial L-serine synthesis. **PNAS published ahead of print** August 21, 2017.
- ZHAO, F. J., et al. Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **New Phytol.** v. 172, p. 646-654, 2006.
- ZHU, J. K. Abiotic stress signaling and responses in plants. **Cell.** v. 167, n. 2, p. 313–324, 2016.
- ZORNOZA, P.; SÁNCHEZ-PARDO, B.; CARPENA, R. O. Interaction and accumulation of manganese and cadmium in the manganese accumulator *Lupinus albus*, **J. Plant Physiol.**, v. 167 p. 1027-1032, 2010.
- ZORZONA, P., VÁZQUEZ, S., ESTEBAN, E., FERNÁNDEZ-PASCUAL, M., CARPENA, R. Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 40, p. 1003–1009, 2002.