

CARLA QUINHONES GODOY SOARES

**EFEITO DO ESTRESSE HÍDRICO NA EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS EM DUAS VARIEDADES DE SOJA
CONTRASTANTES PARA O CONTEÚDO DE ÓLEO E PROTEÍNA**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica Agrícola,
para obtenção do título de *Doctor
Scientiae*

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S676e
2013

Soares, Carla Quinhones Godoy, 1981-

Efeito do estresse hídrico na expressão de proteínas em
duas variedades de soja contrastantes para o conteúdo de óleo e
proteína / Carla Quinhones Godoy Soares. – Viçosa, MG, 2013.
ix, 117f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maurilio Alves Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Déficit hídrico. 2. Soja - Semente. 3. Proteínas.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola. II. Título.

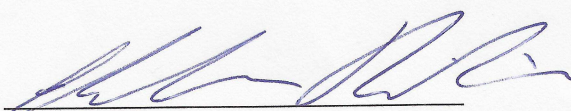
CDD 22.ed. 571.2

CARLA QUINHONES GODOY SOARES

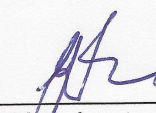
**EFEITO DO ESTRESSE HÍDRICO NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM DUAS
VARIEDADES DE SOJA CONTRASTANTES PARA O CONTEÚDO DE ÓLEO E
PROTEÍNA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

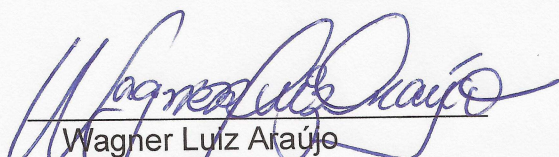
APROVADA: 12 de novembro de 2013.



Cleberson Ribeiro



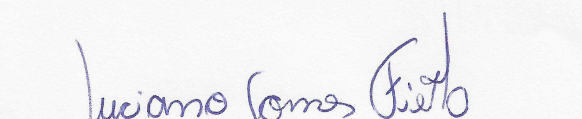
Humberto Josué de Oliveira Ramos



Wagner Luiz Araújo



Arlindo Inês Teixeira



Luciano Gomes Fietto
(Presidente da Banca)

“As mais altas árvores são oriundas de minúsculas sementes.”

Francisco de Paula Cândido Xavier

*Aos meus pais Tadeu e Fátima,
Ao meu marido Ricardo,*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde e pela fé.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio através da concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB), pela formação propiciada através do curso de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola. Em especial, aos professores pelos ensinamentos nas disciplinas.

Ao meu orientador Prof. Maurilio Alves Moreira, pela confiança e orientação, e pelos exemplos de dedicação à pesquisa, de competência, integridade e lealdade. Ao eterno “Jovem”, a minha gratidão por todos os momentos de dedicação e contribuição para o meu aprendizado como pesquisadora.

Ao Prof. Everaldo Gonçalves de Barros, pelos ensinamentos, confiança e amizade. Por se dedicar a me ajudar, me incentivar, e estar sempre preocupado e disponível durante a realização deste trabalho de tese.

Ao Prof. Humberto Josué de Oliveira Ramos, pelos ensinamentos em espectrometria de massa e proteômica, pela confiança, amizade e por não medir esforços em me ajudar.

Ao Prof. Luciano Fietto, pela participação como presidente da banca, pela compreensão e ajuda durante o final desta tese.

Ao Prof. Cleberson Ribeiro, pela confiança, pelos conselhos, por aceitar participar como membro da banca de defesa.

Ao Prof. Wagner L. Araújo e Prof. Arlindo Inês Teixeira, por aceitarem o convite, não medindo esforços para participar da banca de defesa.

Ao secretário da Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, Eduardo Monteiro, pela competência e dedicação, e pelo carinho e apoio nos momentos difíceis.

Ao Dr. Newton D. Piovesan, pelo auxílio nos experimentos da casa de vegetação e durante a realização desta tese.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NUBIOMOL) da Universidade Federal de Viçosa por permitir a realização de etapas deste trabalho.

Ao laboratório de Toxinologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) pela realização de parte deste trabalho. Em especial, aos pesquisadores Dr. Richard Hemmi Valente, Dr. Jonas Enrique Aguilar Perales, Dr. Alexander de Chapeaurouge, pela ajuda nas análises e colaboração.

Ao técnico Reginaldo e ao Dr. Klever, pelas análises realizadas em sementes.

Aos amigos “Proteômicos” Fernanda, Rosilene, Leandro, agradeço muito a todas as horas de ajuda e dedicação. Vocês tornaram a jornada mais divertida. Em especial à Fernanda, pela amizade, pela ajuda incondicional, pelo amparo e carinho.

À amiga “transcriptômica” Maria Fernanda Antunes, pela disposição em me ajudar nos experimentos, pelos bons momentos, pela amizade.

Aos colegas e funcionários do NUBIOMOL, obrigada por ajudarem na realização deste trabalho. Em especial aos técnicos de nível superior Edvaldo e Nívea pela colaboração.

Aos colegas do BIOAGRO, Rafael Bueno, Bruno Balbi, Mateus Pereira, Camilla Sediya, Loreta Buuda, Bianca, Arlindo, Leonardo, Luiz Cláudio Silva, Maria Fernanda Antunes, Renato M. Nunes, Marcos Pinto, Samila Lima, Igor Santos, Isabela Santana, Klever Antunes, Danilo Menezes, Giselle Mendes, Cristiane Zorzatto, Tatiana Antunes, Márcia Carvalho pelos bons momentos e pela boa convivência no ambiente de trabalho. Em especial à Camilla, obrigada pelo auxílio, conselhos, companheirismo e amizade. Em especial ao amigo Renato, obrigada pelos ensinamentos, pelo incentivo, pela amizade, por me ajudar incondicionalmente, pela preocupação comigo e pelo carinho.

Aos alunos de iniciação científica Ana Paula, Igor e Samilla, pela ajuda nos experimentos, dedicação e empenho.

Ao meu marido Ricardo Amorim, pelo amor, carinho e companheirismo. Pela paciência nas horas mais difíceis e por me encorajar a vencer sempre.

Aos meus pais Tadeu e Fátima e ao meu irmão Matheus, pelo amor incondicional e carinho. À minha sobrinha Mariana, tão “pequenina”, mas tão grande, ao me fazer enxergar a vida com leveza e alegria.

Aos meu sogro José Geraldo e minha sogra Regina, por todo carinho e auxílio, pelo exemplo de fé e força.

À todos os meus familiares, pelo carinho essencial. Em especial à minha avó paterna, Conceição, pelo carinho durante a realização desta jornada.

Às amigas, Daniela Neves, Priscila Sequetto, Daniela Ferraz, Andréia Villela, Patrícia Cunha, Talita Barbosa, por serem irmãs que Deus me permitiu escolher. Por me ajudarem de perto e de longe, por compartilharem comigo todos os momentos dessa jornada, pela força, conselhos, pelos bons momentos, pela amizade e carinho.

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

BIOGRAFIA

CARLA QUINHONES GODOY SOARES, filha de José Tadeu Godoy Soares e Maria de Fátima Souza Quinhones Godoy Soares, nasceu em Lorena, SP, em 07 de novembro de 1981. Concluiu o ensino básico em 1999, no Colégio São Joaquim, em Lorena, SP. Em março de 2001, iniciou o curso de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), em Juiz de Fora, MG, graduando-se em Licenciatura em março de 2005, e em Bacharelado, em abril de 2006. Ingressou, em maio de 2006, no Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa (UFV), obtendo o título de mestre em 13 de junho de 2008. Em Agosto de 2008, iniciou como bolsista de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial no Laboratório de Fisiologia Molecular, na UFV, até julho de 2009. Em agosto de 2009, ingressou no Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola na UFV, obtendo o título de Doutora em 12 de novembro de 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	01
OBJETIVOS	05
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	06

CÁPITULO I

DÉFICIT HÍDRICO ALTERA O EQUILÍBRIO CARBONO-NITROGÊNIO E A COMPOSIÇÃO DAS SEMENTES

INTRODUÇÃO	09
MATERIAL E MÉTODOS	10
Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental.....	10
Análises fisiológicas.....	11
Extração de proteínas totais de folhas e raízes.....	12
Quantificação de proteínas e análise do perfil proteico.....	13
Eletroforese bidimensional.....	13
Análise da imagem e quantificação.....	14
Extração peptídica.....	14
Análise por espectrometria de massas.....	15
Extração, purificação de RNA e síntese de cDNA.....	15
Análise de genes pelo qRT-PCR.....	16
Determinação dos conteúdos de óleo e proteína.....	17
RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
Status hídrico, Trocas Gasosas e parâmetros de Fluorescência da clorofila....	18
Análise do proteoma diferencial em folhas e raízes do genótipo Suprema por espectrometria de massas.....	21
Análise da expressão gênica relativa em folhas e raízes por qRT-PCR.....	51
Análise do conteúdo de óleo e proteína por FT-NIR.....	55
CONCLUSÕES	57

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
--	-----------

CÁPITULO II

ANALISE PROTEÔMICA E TRANSCRIPTOMICA DE SOJA SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO NO ESTÁGIO REPRODUTIVO

INTRODUÇÃO.....	78
MATERIAL E MÉTODOS.....	79
Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental.....	79
Análises fisiológicas.....	80
Extração de proteínas totais de folhas.....	81
Quantificação de proteínas e análise do perfil proteico.....	82
Eletroforese bidimensional.....	82
Análise da imagem e quantificação.....	82
Extração peptídica.....	83
Análise por espectrometria de massas.....	84
Extração, purificação de RNA e síntese de cDNA.....	84
Análise da expressão de genes pelo qRT-PCR.....	85
Determinação dos conteúdos de óleo e proteína.....	86
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
Status hídrico, Trocas Gasosas e parâmetros de Fluorescência da clorofila...	87
Análise do proteoma diferencial em folhas e raízes do genótipo UFVTN105AP por espectrometria de massa.....	90
Análise da expressão gênica relativa em folhas por qRT-PCR.....	104
Análise do conteúdo de óleo e proteína por FT-NIR.....	106
CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

RESUMO

SOARES, Carla Quinhones Godoy, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2013. **Efeito do estresse hídrico na expressão de proteínas em duas variedades de soja contrastantes para o conteúdo de óleo e proteína.** Orientador: Maurilio Alves Moreira.

Elucidar os processos bioquímicos e fisiológicos que ocorrem em resposta ao estresse hídrico durante o período de desenvolvimento reprodutivo em plantas é importante para prever os impactos das alterações climáticas sobre a qualidade das sementes. Neste trabalho, as variedades de soja Suprema e UFVTN105AP, de sementes com alto teor de óleo e baixo teor de proteína, e baixo teor de óleo e alto teor de proteína, respectivamente, foram submetidas ao déficit hídrico no estágio R5. Neste ponto, foram analisados parâmetros fisiológicos, coletadas folhas e raízes para análise proteômica, seguida de seqüenciamento em espectrômetro de massa (MALDI-TOF-TOF), e identificação pelo Mascot 4®. Foram realizadas análises de PCR quantitativo em tempo real, sendo a quantificação relativa da expressão gênica feita pelo método $2^{-\Delta ct}$, utilizando o termociclador SDS ABI PRISM 7500. As plantas foram re-irrigadas, após este ponto, e foram coletadas sementes em R8 para análise do conteúdo de óleo e proteína por espectrofotometria do infravermelho próximo (FT-NIR). Foi verificado, em sementes de plantas submetidas ao déficit hídrico, uma redução no conteúdo de óleo em ambas as variedades, e um aumento no conteúdo de proteína na variedade Suprema. As duas variedades apresentaram uma redução na expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de carbono, como a fosfoglicerato cinase, gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase, ferrodixina NADPH redutase, ATP sintase e quinona oxidoreductase, que estão relacionadas com a redução do conteúdo de óleo nas sementes. O aumento na expressão de enzimas relacionadas com o metabolismo do nitrogênio, como Glutamina sintetase, proteína 14-3-3, Vsp β , isoflavona redutase e chalcona isomerase, foram observadas na variedade Suprema, tanto em folhas quanto em raízes, e foram relacionadas com o aumento no conteúdo de proteína na semente. A variedade Suprema, em condições de estresse hídrico, mostrou uma elevada expressão da enzima Glutamina sintetase em folhas, o que não foi observado na UFVTN105AP. Este fato pode estar relacionado com o diferente comportamento das duas variedades em relação ao acúmulo de proteína na semente. Os resultados mostram que alterações na composição de óleo e proteína da semente estão relacionadas com a intensidade e duração do estresse hídrico, e ainda, dependentes da variedade em estudo.

ABSTRACT

SOARES, Carla Quinhones Godoy, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2013. **Effect of hydric stress on protein expression in two contrasting soybean varieties for oil and protein content.** Adviser: Maurilio Alves Moreira.

Elucidate the biochemical and physiological processes that occur in response to water stress during plant reproductive development is important for predicting climate impacts on seed quality. In this study, Suprema and UFVTN105AP soybean varieties, which seeds with high oil content and low in protein, and low oil content and high protein content, respectively, were subjected to water deficit in the R5 stage. At this point, physiological parameters were analyzed, leaves and root were collected for two-dimensional gels associated to sequencing by mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF), and identification by Mascot ® 4. Real Time Quantitative PCR analyzes were performed, and the relative quantification of gene expression made by $2^{-\Delta Ct}$ method using the ABI PRISM 7500 SDS thermocycler. Plants were re-watered after this point, and R8 seeds were collected in order to analyze protein and oil content by Near Infrared Spectroscopy (FT- NIR) . Plants subjected to drought have seeds with reduction in oil content in both varieties , and an increase in protein content in the Suprema. Both varieties showed a reduction in the expression of enzymes involved in carbon metabolism , such as phosphoglycerate kinase , glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, ferredoxin NADPH reductase, ATP synthase, and quinone oxidoreductase , which are related with the reduction of oil content in seeds. The increased expression of enzymes related to nitrogen metabolism, such as glutamine synthetase, protein 14-3-3, Vsp β , isoflavone reductase and chalcone isomerase, were observed in the Supreme variety, both in leaves and in roots, and were related to increase in the protein content of the seed. Suprema in water stress conditions, showed a high expression of glutamine synthetase in leaves, which was not observed in UFVTN105AP. This fact may be related to the different behavior of the two varieties in relation to the accumulation of protein in the seed. The results show that changes in the seed oil and protein content are related to intensity and duration of the drought stress, and depends on the variety of study.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja é a leguminosa de maior importância econômica, com uma produção mundial de cerca de 260 milhões de toneladas anuais. Segundo a CONAB, a produção brasileira na safra de 2013/2014 estimada é de 89.72 milhões de toneladas no país (Acompanhamento Safra Brasileira de Grãos, Levantamento outubro, 2013). O “complexo soja” é uma das principais alavancas do agronegócio brasileiro, e se destaca tanto pela sua expressiva participação na pauta de exportações sob a forma de farelo, óleo e grãos, como também para o suprimento do mercado interno de óleos comestíveis e derivados protéicos. O interesse mundial pelo cultivo desta leguminosa deve-se à excelente combinação apresentada em termos de produtividade, baixo custo de produção e altas porcentagens de óleo e proteína, em média, 20 e 40% do peso das sementes, respectivamente.

Sendo o material processado a partir da soja fonte de proteínas e lipídios, sua inclusão na alimentação humana do mundo ocidental tem se tornado cada vez maior. A maioria dos produtos proteicos desengordurados de soja é utilizada na alimentação de aves, suínos, bovinos e outros animais domésticos, como suplemento proteico (farelos). Os principais produtos proteicos de soja utilizados na alimentação humana são as farinhas, com cerca de 50% de proteína; concentrados proteicos, com cerca de 70%, e isolados proteicos de soja, com 90% a 97% de proteína. Farinhas (integral e desengordurada), concentrados e isolados proteicos de soja podem ser processadas por vários métodos e utilizados em inúmeros produtos alimentícios. A proteína de soja também é utilizada na elaboração de adesivos e plásticos (Kumar et al., 2002). Estudos, utilizando diferentes métodos de melhoramento, têm sido realizados tentando reduzir a correlação negativa entre produtividade e teor de proteína a fim de desenvolver cultivares de soja com altos teores de proteína e produtivas (Wehrmann *et al.*, 1987). Portanto, existe uma demanda por pesquisas que visem aumentar o teor de proteína da soja no intuito de suprir o mercado industrial e alimentício.

A soja também tem sido vista como uma cultura atraente para a produção de biodiesel (Pimentel; Patzek, 2008). O óleo de soja é o líder mundial entre os óleos vegetais e é responsável por 20 a 24% do total que são consumidos no mundo.

Desde a década de 1980, o Programa de Melhoramento da Qualidade e do Sabor da Soja do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO)/Universidade Federal de Viçosa (UFV) vem trabalhando no desenvolvimento de cultivares de soja mais adequadas para a agroindústria. No entanto, com o crescente interesse no uso da soja como fonte de óleo para a produção de biodiesel, o referido programa tem também orientado seus esforços para a criação de cultivares de soja com elevado conteúdo de óleo e com composição modificada de ácidos graxos. Nesta linha, foram produzidas diversas linhagens com baixíssimo teor de ácido linolênico e com teor médio de ácido oleico. Estão sendo realizados cruzamentos para incorporar, em variedades comerciais de soja, genes que determinam elevado conteúdo de óleo no grão.

Entretanto, alguns estudos mostram que o conteúdo total de óleo e proteína podem ser alterados por fatores ambientais. O crescimento e desenvolvimento das plantas podem ser afetados por uma série de estresses abióticos e bióticos. Entre as diferentes restrições ambientais, a seca é o fator abiótico mais limitante na produtividade das culturas. Grande parte das oscilações da produção brasileira de soja é atribuída à ocorrência de secas prolongadas, sendo estimado em escala mundial, uma média de redução do rendimento na produtividade das culturas em mais de 50% (Bray et al., 2000; Wang et al., 2003).

O déficit hídrico que ocorre durante o estágio reprodutivo tem um impacto muito maior na produção da soja do que limitações hídricas que ocorrem durante o estágio vegetativo (Doss et al., 1974; Ashley; Ethridge, 1978; Brown et al., 1985). Déficits hídricos que acontecem durante o período de enchimento do grão (R5-R7) reduzem o tamanho da semente (Snyder et al., 1982; Andriani et al., 1991; DE Souza et al., 1997; Brevedan; EGLI, 2003). Alguns autores mostraram que déficits hídricos durante o enchimento do grão podem reduzir seu peso pela pequena duração do período de enchimento (Meckel et al., 1984; Westgate; Grant, 1989; Desclaux; Roumet, 1996; Egli; Bruening, 2004). Sabe-se também que a redução no rendimento de grãos induzida pela seca é variável, devido às diferenças no tempo e intensidade do estresse imposto e dos genótipos (Ramirez-Vallejo; Kelly, 1998).

Uma série de mecanismos têm sido propostos para explicar alterações na composição das sementes. Maior capacidade de dreno de sacarose para os embriões (Westgate; Grant, 1989), falta de ligações diretas entre tecidos

vasculares parentais e da semente em desenvolvimento (Westgate; Grant, 1989), aumento da atividade de invertase ácida pelo ácido abscísico (Liu et al., 2005) e alterações na relação fonte-dreno (DE Souza et al., 1997).

Recentemente, uma meta-análise realizada (Rotundo; Westgate, 2009) mostrou que o déficit hídrico durante a fase de enchimento do grão aumenta a concentração de proteína e diminui a de óleo. A diferença na resposta de conteúdos dos componentes resulta no aumento da concentração de proteínas nas sementes de plantas que foram submetidas ao déficit hídrico (Rotundo; Westgate, 2009).

Em plantas, as condições de déficit hídrico induzem respostas fisiológicas e bioquímicas (Shinozaki; Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Estas respostas incluem o fechamento estomático, repressão de crescimento celular, redução da taxa fotossintética, aumento da taxa respiratória, ajustamento osmótico, diminuição na eficiência do uso de água, modulação da partição de assimilados e defesas contra danos oxidativos (Ludlow; Muchow, 1990). Na medida em que a água torna-se limitante por causa do fechamento estomático, ocorre uma limitação de dióxido de carbono disponível para fixação da fotossíntese e como resultado um decréscimo na eficiência quântica e um excesso de energia nos centros de reação dos fotossistemas, envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio (superóxido, O_2^- ; oxigênio singlete, 1O ; peróxido de hidrogênio, H_2O_2 ; radicais hidroxil, OH^- ; entre outros) que causam peroxidação de lipídeos, danos celulares, inativação de enzimas do ciclo de Calvin (Tambussi et al., 2000). Sob condições de déficit hídrico, os danos oxidativos são potencializados e a produção de espécies reativas de oxigênio resultam em danos fotoinibitórios e fotooxidativos (Smirnoff, 1995; Asada, 1999).

Com a queda da taxa fotossintética durante o período de déficit hídrico, a quantidade de assimilados disponíveis para exportação para os órgãos drenos é reduzida (Kim, 2000; Huber, 1984). Em adição, a taxa de exportação de sacarose da fonte (folhas) para órgãos dreno (frutos / sementes) depende da taxa fotossintética e da concentração de sacarose foliar (Fader; Koller, 1983; Huber et al., 1984; Grodzinski et al., 1998; Komor, 2000). A redução na concentração de sacarose nas folhas é devido a um aumento da atividade da invertase ácida induzida pelo estresse hídrico (Pelleschi et al., 1997; Kim et al., 2000). Sendo

assim, tanto uma baixa taxa de fotossíntese como uma baixa concentração de sacarose nas folhas podem causar uma diminuição da taxa de exportação de sacarose para os órgãos dreno, e assim, afetar o desenvolvimento reprodutivo.

O déficit hídrico induz a expressão de proteínas relacionadas com a biossíntese de osmólitos (Ishitani et al., 1995), absorção e compartimentação de íons (Lisse T, 1996), eliminação de radicais hidroxila (Ingram; Bartels, 1996), proteção da estrutura celular (Neslihan-Ozturk et al., 2002) e proteínas relacionadas com a fotossíntese (Neslihan-Ozturk et al., 2002). Portanto, as condições de déficit hídrico induzem alterações no padrão de expressão de proteínas de folhas, raízes e sementes.

Ao longo dos anos, muitos genes que respondem aos estresses abióticos, em nível transcricional, têm sido identificados em várias plantas, e muitos deles têm um papel importante na tolerância à seca (Shinozaki; Yamaguchi-Shinozaki, 2007). As análises do proteoma em condições de estresse permitem identificar proteínas importantes relacionadas a esta resposta.

A proteômica tem possibilitado o estudo de processos biológicos dinâmicos com a análise sistemática do perfil protéico expresso sob determinada condição em um organismo, e ainda o mapeamento de vias metabólicas e identificação de genes alvos que podem ser usados na manipulação genética (Pandey; Mann, 2000; Patterson; Aebersold, 2003).

2. OBJETIVOS

Identificar os mecanismos bioquímicos e fisiológicos envolvidos na resposta de plantas de soja ao estresse hídrico e seus efeitos sobre o conteúdo de óleo e proteína da semente.

2.1. Objetivo específicos

- Identificar proteínas e respectivas funções, com expressão diferencial, em folhas e raízes em soja submetidas ao déficit hídrico no estágio reprodutivo;
- Correlacionar as funções destas proteínas, diferencialmente expressas em condições de estresse hídrico, com o acúmulo de proteína e óleo nas sementes das variedades de soja.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acompanhamento Safra Brasileira de Grãos, Levantamento outubro. **CONAB**. Brasília, p. 1-63. 2013.

ANDRIANI J. M. et al. Water deficits during reproductive growth of soybeans: 1. Their effects on dry-matter accumulation, seed yield and its components. **Agronomie**, v. 11, p. 737-746, 1991.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 601-639, 1999.

ASHLEY, D. A.; ETHRIDGE, M.J. Irrigation effects on vegetative and reproductive development of 3 soybean cultivars. **Agronomy Journal**, v. 70, p. 467-471, 1978.

BRAY E. A. et al. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. [S.l.]: [s.n.], 2000.

BREVEDAN, R. E.; EGLI, D. B. Short periods of water stress during seed filling, leaf senescence, and yield of soybean. **Crop Science**, v. 43, p. 2083-2088, 2003.

BROWN E. A. et al. Response of selected soybean cultivars to soil-moisture deficit. **Agronomy Journal**, v. 77, p. 274-278, 1985.

DE SOUZA, P. I. et al. Water stress during seed filling and leaf senescence in soybean. **Agronomy Journal**, v. 89, p. 807-812, 1997.

DESCLAUX, D.; ROUMET, P. Impact of drought stress on the phenology of two soybean (*Glycine max* L. Merr) cultivars. **Field Crops Research**, v. 46, p. 61-70, 1996.

DOSS, B. D. et al. Effect of soil-water stress at various growth stages on soybean yield. **Agronomy Journal**, v. 66, p. 297-299, 1974.

EGLI, D. B.; BRUENING, W. P. Water stress, photosynthesis, seed sucrose levels and seed growth in soybean. **Journal of Agricultural Science**, v. 142, p. 1-8, 2004.

FADER, G. M.; KOLLER, H. R. Relationships between carbon assimilation, partitioning, and export in leaves of two soybean cultivars. **Plant Physiology**, p. 297-303, 1983.

FRIEDMAN M.; BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1069-1086, 2001.

GRODZINSKI, B. et al. Estimating photosynthesis and concurrent export rates in C3 and C4 species at ambient and elevated CO2. **Plant Physiology**, v. 117, p. 207-215, 1998.

HUBER, S. C. et al. Effects of water stress on photosynthesis and carbon partitioning in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants grown in the field at different CO2 levels. **Plant Physiology**, v. 76, p. 244-249, 1984.

INGRAM, J.; BARTELS, D. T. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 377-403, 1996.

ISHITANI, M. et al. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. **Plant Molecular Biology**, v. 27, p. 307-315, 1995.

KIM, J. Y. et al. maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. **Plant Physiology**, v. 124, p. 71-84, 2000.

KOMOR, E. Source physiology and assimilate transport: the interaction of sucrose metabolism, starch storage and phloem export in source leaves and the effects on sugar status in phloem. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 27, p. 497-505, 2000.

- LEVITT, J. II: Water radiation, salt and other stress. In: **Response of plants to environmental stress**. [S.l.]: Academic Press, 1980. p. 606.
- LISSE, T. et al. The recombinant dehydrin-like desiccation stress protein from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* displays no defined three-dimensional structure in its native state. **Biological Chemistry**, v. 377, p. 555-561, 1996.
- LIU, F. L. et al. A review of drought adaptation in crop plants: Changes in vegetative and reproductive physiology induced by ABA-based chemical signals. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 56, p. 1245-1252, 2005.
- LUDLOW, M. M.; MUCHOW, R. C. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. **Advances in Agronomy**, v. 43, p. 107-153, 1990.
- MECKEL, L. et al. Effect of moisture stress on seed growth in soybeans. **Agronomy Journal**, v. 76, p. 647-650, 1984.
- NESLIHAN-OZTURK, Z. et al. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 551-573, 2002.
- PANDEY, A; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-845, 2000.
- PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature Genetics**, v. 33, p. 311-323, 2003.
- PELLESCHI, S. et al. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. **Plant Cell Environmental**, v. 20, p. 493-503, 1997.
- PIMENTEL, D.; PATZEK, T. Ethanol production using corn, switchgrass and wood; biodiesel production using soybean. In: **Biofuels, Solar and Wind as Renewable Energy Systems**. New York: Springer, 2008. p. 373-394.
- KUMAR, R. et al. Adhesives and plastics based on soy protein products. **Industrial Crops and Products**, 16, 2002. 155-172.
- RAMIREZ-VALLEJO, P.; KELLY, J. M. Traits related to drought resistance in common bean. **Euphytica**, v. 99, p. 127-136, 1998.
- ROTUNDO, J. L.; WESTGATE, M. Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition. **Field Crops research**, v. 110, p. 147-156, 2009.
- SACKS, F. M. et al. Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health. **Circulation**, v. 113, p. 1034-1044, 2006.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 221-227, 2007.
- SMIRNOFF, N. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: **Environment and plant metabolism-flexibility and acclimation**. First edition. Oxford: Scientific Publishers, 1995. p. 217-243.
- SNYDER, R. L. et al. Yield of indeterminate soybeans in response to multiple periods of soilwater stress during reproduction. **Agronomy Journal**, v. 74, p. 855-859, 1982.
- TAMBUSSI, E. A. et al. Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). **Physiology Plantarum**, v. 108, p. 398-404, 2000.
- WANG, W. et al. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p. 1-14, 2003.

WEHRMANN, V. K. et al., Transfer of high seed protein to high-yielding soybean cultivars. **Crop Science**, [s.n.], p927-931, 1987.

WESTGATE, M. E.; GRANT, D. T. Effects of water deficits on seed development in soybean: I. Tissue water status. **Plant Physiology**, v. 91, p. 975-979, 1989.

CAPÍTULO 1

DÉFICIT HÍDRICO ALTERA O EQUILÍBRIO CARBONO-NITROGÊNIO E A COMPOSIÇÃO DAS SEMENTES

INTRODUÇÃO

Os efeitos das condições ambientais na cultura de soja têm sido extensivamente reportados através da ocorrência de mudanças morfológicas no estágio vegetativo, e a redução na qualidade e quantidade de sementes (Frederick et al., 2001; Brevedan & Egli, 2003; Specht et al., 2001).

A seca, entre as diferentes restrições ambientais, é uma dos fatores mais limitantes para a produtividade das culturas, sendo estimado em escala mundial uma média de redução do rendimento na produtividade das culturas em mais de 50% (Wang, 2003). As condições de déficit hídrico induzem respostas fisiológicas e bioquímicas nas plantas desencadeando respostas em níveis celulares e moleculares (Shinozaki et al., 2007). No entanto, pouco ainda se sabe a cerca de como esses mecanismos podem induzir alterações na composição de sementes sob condições ambientais desfavoráveis (Rotundo; Westgate, 2010).

O déficit hídrico que ocorre durante o estágio reprodutivo tem um impacto muito maior na produção de soja do que déficits hídricos que ocorrem durante o estágio vegetativo (Doss, 1974; Ashley; Ethridge, 1978; Brown, 1985). Uma série de mecanismos têm sido propostos para explicar alterações na composição das sementes: maior capacidade de dreno de sacarose para os embriões (Westgate; Grant, 1989), a falta de ligações diretas entre tecidos vasculares parentais e da semente em desenvolvimento (Westgate; Grant, 1989), aumento da atividade invertase ácida pelo ácido abscísico (Liu, 2005), e, principalmente, alterações na relação fonte-dreno (De Souza, 1997).

São bastante tênues os conhecimentos sobre os processos fisiológicos envolvidos na alteração dos teores de óleo e proteína nas sementes de soja em condições de estresse hídrico. Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo entender esses processos que são fundamentais nos trabalhos de melhoramento genético, que visam o aumento dos teores de óleo e ou de proteína; ou ainda a elucidação dos mecanismos envolvidos nas respostas das plantas ao estresse

hídrico, crucial na previsão dos impactos negativos das alterações climáticas sobre a qualidade das sementes.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental

Foi utilizada a variedade de soja Suprema da espécie *Glycine max* obtida pela empresa Nidera. Esta variedade possui teor de óleo em torno de 23% e de proteína em torno de 33% em suas sementes, tendo grupo de maturação semi-tardio e crescimento indeterminado. As plantas utilizadas nos experimentos de déficit hídrico foram cultivadas em casa de vegetação do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa, contendo sistema de monitoramento de temperatura. As sementes foram plantadas em vasos de 5 litros preenchidos com 4,5 kg de solo, esterco e areia, na proporção de 3:1:1 (v/v/v), adicionado a estes a mistura NPK 4:14:8, super simples, calcário e cloreto de potássio. Após 10 dias de germinação as plântulas foram irrigadas com solução de inoculação 20 mL/L (v/v) com bactéria específica para a soja, denominada *Bradyrhizobium japonicum*. As plantas receberam irrigação contínua na capacidade de campo até a aplicação do estresse hídrico. O estresse hídrico foi imposto no período de desenvolvimento reprodutivo, na passagem do período R4 para o período R5. O estágio R4 caracteriza-se pela frutificação plena, onde a maioria das vagens no terço superior da haste principal está com comprimento de 2 a 4 cm. O estágio R5 se caracteriza pelo início da formação da semente ou início da granação, ou seja, a partir deste estágio torna-se perceptível ao tato ou a visão o preenchimento das vagens (enchimento dos grãos) através do acúmulo progressivo de matéria seca na forma de grãos. A fase R5 está subdividida em cinco etapas de acordo com classificação da empresa *Stoller*®.

As plantas foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle, capacidade de campo máxima do solo) ou submetidas ao déficit hídrico, imposto pela manutenção de 40% de água disponível no solo, sendo o potencial hídrico na antemanhã (Ψ_{am}) medido diariamente para acompanhar a situação de estresse nestas plantas. Foram realizadas medições do potencial hídrico (antemanhã), trocas gasosas (taxas fotossintética e da condutância estomática) e parâmetros da fluorescência em folhas no intervalo de três dias. Amostras de folha e raiz foram

coletadas ao final do período de estresse, e imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido a -80 °C para posteriores análises. Foram plantadas 20 plantas sendo estas divididas em 10 plantas submetidas ao tratamento e 10 plantas submetidas à situação controle. Destas 10 plantas, 5 foram destinadas a coleta de folha e raízes no final no estresse hídrico de -1,5 MPa. As outras 5 plantas, após o déficit hídrico de -1,5 MPa, foram re-irrigadas e acompanhadas até o final do desenvolvimento reprodutivo (maturidade fisiológica) para a coleta das sementes maduras (R8).

Análises fisiológicas

O potencial hídrico foliar (Ψ_H) foi determinado em folhas completamente expandidas, por meio de uma bomba de pressão do tipo Scholander, na antemã, conforme descrito por DaMatta et al. (1997). A medida de condutância estomática ao vapor de água (g_s) foi determinada em sistema aberto, sob luz saturante, por volta das 08:00 h, com um analisador de gases a infravermelho portátil (LCA-4, ADC, Hoddesdon, Reino Unido). A taxa de assimilação líquida de carbono (A) foi determinada em sistema aberto sob luz saturante por volta das 08:00 h com um analisador de gases a infravermelho portátil (LCA-4, ADC, Hoddesdon, Reino Unido).

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram medidos nas mesmas folhas utilizadas para medições de trocas gasosas por meio de um fluorômetro com amplitude de pulso modulado (PEA, Hansatech, Norfolk, Reino Unido), segundo Schreiber et al. (1995). As medições realizadas na antemã determinaram a fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável ($F_v = F_m - F_0$), e eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII) (F_v/F_m), parâmetros estes determinados em condições de escuro. Às 8:00 h foram determinados as variáveis de fluorescência constante (F_s') e fluorescência máxima (F_m'), parâmetros determinados em condições de luminosidade. Folhas adaptadas ao escuro por 30 min foram iluminadas com pulsos de luz vermelha de baixa intensidade e frequência para obtenção da fluorescência inicial (F_0). Um pulso de luz saturante de pulso de 6000 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ foi aplicado por um segundo para medir a emissão de fluorescência máxima (F_m). Com esses parâmetros foi estimado o rendimento quântico efetivo através do $\text{FSII} = (F_m' - F_0) / (F_m' - F_s')$.

F_s'/F_m'], conforme Genty et al., 1989. O coeficiente de extinção fotoquímica (qp), foi determinado segundo Schreiber et al. 1994. Foi estimada F_0' adaptada a luz $F_0' = F_0/(F_v/F_m + F_0/F_m')$, de acordo com Oxboroug & Baker (1997). O coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) foi determinada pela equação onde $NPQ = (F_m/F_m') - 1$, segundo Krause & Weiss (1991). A fração de irradiância não utilizada na fase fotoquímica nem dissipada termicamente foi determinada como $PE = (F_v'/F_m') \cdot (1 - qp)$, segundo Demming-Adams et al. (1996). A taxa de transporte de elétrons foi calculada segundo a fórmula $ETR = \Phi_{PSII} \times 0,5 \times FFF \times AL$, onde AL é a absorbância luminosa para *Coffea* sp. (Dias, 2006), e FFF é a intensidade de fluxo fotônico $1000 \mu\text{mol de } \phi\text{tons. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, e 0,5 a fração de energia distribuída para o PSII. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa SAS ("Statistical Analysis System") versão 8.0 pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Extração de proteínas de folhas e de raízes

A extração de proteínas de folhas e de raízes de soja foi feita em triplicata, com base em protocolo proposto por Wang et al. 2003. Aproximadamente 2,5g de amostra foi macerado em nitrogênio líquido, em almofariz e pistilo. Em seguida, foram acrescentados 15 mL de uma solução contendo PVPP 1% (*polyvinylpolypyrrolidone*), beta-mercaptoetanol 2%, PMSF 1mM (*phenylmethylsulphonylfluoride*) e acetona gelada. A mistura foi agitada e sonicada à potência de 30% da potência máxima do aparelho *UltraSonic Processor* (Modelo GE 50) (amplitude de 70 dB), centrifugada a 6000 *g*, a 4º C. Na sequência, o precipitado (*pellet*) foi lavado sucessivamente em acetona, TCA 10% (ácido tricloroacético) em acetona, TCA 10% (ácido tricloroacético) em água, acetona 80% e etanol 80%. As lavagens foram seguidas por centrifugação a 6000 *g*, a 4º C. Ao final do processo, o precipitado foi seco a temperatura ambiente e armazenado a -80ºC. Em uma segunda etapa, 10 mL do tampão SDS (sulfato de dodecil sódio) denso (sacarose 30%; SDS 2%; Tris-HCl 0,1M, pH 8,0; β -mercaptoetanol 2%; PMSF 1mM) foi acrescentado ao pó obtido na etapa anterior e a mistura foi agitada. Em seguida, foi acrescentado 5 mL de fenol tamponado pH 8,0 e, após agitação a mistura foi centrifugada a 6.000 *g*, a 4 ºC. Foi descartado o sobrenadante, e o precipitado ressuspenso pela adição de 20 mL de acetato de amônio 0,1 M em metanol gelado e a mistura foi centrifugada a 6.000 *g* a 4 ºC. Em seguida, o

precipitado foi lavado na seguinte sequência: acetato de amônio 0,1 M em metanol, acetona 80%, etanol 70%. Todas as lavagens foram seguidas de centrifugação a 6.000 g, a 4 °C. Finalmente, o precipitado foi seco à temperatura ambiente, solubilizado com tampão de amostra (Uréia 7M, Tiouréia 2M e CHAPS 4% (3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate)), sonificado a 10% da potência máxima do aparelho UltraSonic Processor (Modelo GE 50) (amplitude de 70 dB), e armazenado a -80 °C.

Quantificação de proteínas e análise do perfil proteico

A concentração proteica nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A eficiência da extração foi determinada pela integridade do perfil proteico (ausência de rastros de degradação por proteases). Foram feitas análises de pureza das amostras e presença de degradação em gel SDS-PAGE (Laemmli, 1970). As amostras proteicas foram desnaturadas a 95°C por 5 min e resolvidas em gel SDS-PAGE 12% (40 µg de proteína por linha). Os géis SDS-PAGE foram corados com azul de coomassie R-250.

Eletroforese bidimensional

Para o gel bidimensional, na primeira dimensão ou focalização isoeletrica (IEF) foram usadas fitas de 18 cm e pH 4–7 (GE Healthcare) que foram reidratadas de 14-20 h em 500µl de tampão de reidratação (Uréia 8M, CHAPS 2%, Azul de bromofenol 0.002%, IPG-buffer 2%, DTT 0.2%) juntamente com 800µg de proteína em aparato de reidratação IPGBOX (GE Healthcare). A IEF realizada no IPGphor III (GE Healthcare, Upsala, Suécia) a 20°C, segundo recomendação do fabricante para tiras de 18 cm, 4-7 pH. A amperagem máxima foi de 50µA por tira. Para a análise da segunda dimensão, as fitas foram equilibradas por 15 min em 10 mL de solução de equilíbrio (Uréia 6M, Glicerol 30 %, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002%, 50 mM de Tris pH 8.8) contendo 100 mM de DTT e 250 mM de iodoacetamida. A separação da segunda dimensão realizada no *Protean Daltsix* (GE Healthcare Upsala, Suécia) com espaçadores de 1,5 mm em gel de poliacrilamida 12%. As condições da eletroforese foram 30 min 15 mA/gel, 6 h 30 mA/gel, e marcador molecular do tipo “Low Molecular Weight” para eletroforese (GE Healthcare).

Análise da imagem e quantificação

Os géis foram corados pela adição de azul de coomassie G-250 coloidal 0,02% por 72 h, e fixados três vezes em solução contendo ácido fosfórico 2% e etanol 30% por 30 min. Em seguida, enxaguado três vezes em ácido fosfórico 2% por 20 min, e incubado em solução contendo etanol 18%, sulfato de amônio 15% e ácido fosfórico 2% por 30 min e mantidos em solução de ácido acético 1% até a digitalização. Os géis corados foram escaneados e calibrados com o programa *Labscan* (GE Healthcare). As análises de imagem foram realizadas no *ImageMaster 2D platinum* (GE Healthcare). Nas análises foram considerados spots diferencialmente expressos aqueles que apresentaram uma variação na porcentagem de volume entre os tratamentos de 1,5 vezes ou mais em pelo menos três géis, contendo proteínas oriundas de extrações e réplicas biológicas independentes, e ANOVA ($p < 0,05$).

Extração peptídica

Os *spots* excisados dos géis foram transferidos para microtubos de 0,6 mL e digeridos com a enzima tripsina (Trypsin gold, mass spectrometry grade, Promega). A digestão foi realizada segundo protocolo de digestão trípica estabelecido por Shevchenko (Shevchenko et al, 2006), onde os pedaços de géis excisados são descorados em 3 lavagens com solução de acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,0. Após a segunda lavagem, deixa *overnight* sob agitação constante, e por último a terceira lavagem. A acetonitrila foi removida e o gel foi desidratado com 200 μ L de acetonitrila (100%). Remove-se a acetonitrila e seca os géis no vácuo por 15 minutos. Os pedaços de gel foram reduzidos em 100 μ L de DTT 65 mM por 30 minutos, à temperatura de 56 °C. Posteriormente alquilados com 100 μ L de iodoacetamida 200 mM, por 30 min à temperatura ambiente, lavados com solução de bicarbonato de amônio 100 mM por 10min e desidratados com 200 μ L de acetonitrila por 5 minutos. A acetonitrila foi removida e feita nova reidratação com 200 μ L de bicarbonato de amônio 100 mM, seguido de duas etapas de desidratação com 200 μ L de acetonitrila 100%. Após remoção da solução de acetonitrila, os géis foram secos à vácuo por 15 minutos. Foram adicionados 20 μ L de uma solução de tripsina 25 ng μ L⁻¹ por 45 minutos no gelo. Em seguida, foi adicionada uma solução de 50 μ L de bicarbonato de amônio 40 mM em acetonitrila 10%, *overnight* à 37 °C. As amostras constituídas

de peptídeos obtidos por digestão trípica foram purificadas e dessalinizadas utilizando ponteiros de 0,6 µL ZipTip® com resina C₁₈ (Millipore) segundo o protocolo do fabricante. Primeiramente, as ponteiros ZipTip® C₁₈ foram lavadas com uma solução de acetonitrila 100% , usando o volume máximo de 10 µL da ponteira, certificando-se de que foram feitas 10 lavagens, dispensando sempre a solução após cada lavagem. Após a etapa de carregamento, as ponteiros foram lavadas com solução de ácido trifluoroacético 0,1%, aspirando e dispensando a solução cerca de 10 vezes. Em um microtubo contendo 1,5 µL de solução de acetonitrila 50% em ácido trifluoroacético 0,1%, os peptídeos foram eluídos aspirando e dispensando a amostra 10 vezes dentro do mesmo microtubo.

Análise por espectrometria de massas

As amostras foram aplicadas na proporção 1:1 de amostra e ácido α -ciano-4-hidrocinâmico em 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético. Os fragmentos resultantes da digestão trípica foram analisados no intervalo de 800–3500 Da no instrumento SCIEX TOF/TOF™ 5800 System (*Applied Biosystems*) do Laboratório de Toxinologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), tanto no modo MS quanto MS/MS, com intervalo de confiança monoisotópica de 0,1 Da. Os peptídeos foram identificados usando o algoritmo de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF), e algoritmo *MS/MS Ion Search*, ambos contidos no programa Mascot 4®, utilizando como parâmetros: peptídeos com até dois sítios de clivagem, erro de 0,1 Da, e como modificações variáveis a carbamidometilação dos resíduos de cisteína, oxidação dos resíduos de metionina e deaminação dos resíduos de asparagina e glutamina. Para visualização dos espectros, organização e validação de todos dados gerados foi utilizando o software *SCAFFOLD*® (*Confident protein identification*, ©2006 Proteome Software Inc), usando 95% de filtro de probabilidade para proteínas e peptídeos, e ainda foi considerado a porcentagem de cobertura de cada proteína.

Extração, purificação de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA total das folhas e raízes de soja foi realizada com o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Para cada tratamento foram feitas três extrações individuais de amostras de 100 mg de folhas e 100mg de raiz. Após extração, foi determinada a concentração de RNA total no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies,

Rockland, DE, EUA) e a qualidade do RNA foi avaliada pela integridade das bandas do RNA ribossômico em gel de agarose 1,5%. A pureza foi determinada pela razão das absorbâncias a 260 nm e 280 nm. A seguir, o RNA total foi tratado com DNase RNase Free (Promega, Madison, EUA), seguindo as recomendações do fornecedor. As amostras foram novamente quantificadas e avaliadas quanto à integridade, como descrito anteriormente. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 1 µg do RNA total, utilizando a transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o *primer* Oligo(dT)¹²⁻¹⁸ (Sigma Aldrich, São Paulo, SP), de acordo com as recomendações dos fornecedores.

Análise da expressão de genes via qRT-PCR

Os genes utilizados foram escolhidos pelos resultados apresentados através da proteômica diferencial, e verificando a provável localização desses genes em rotas metabólicas de resposta a estresses abióticos. Na Tabela 1, está representada a sequência dos “primers” que foram desenhados pela ferramenta *Primer Blast* presente no site NCBI. Os números de acesso descritos foram obtidos pela busca de similaridade das sequências das proteínas obtidas através de espectrometria de massa com as sequências de proteínas depositadas nos bancos de dados Phytozome (<http://www.phytozome.net/soybean>) com a espécie *Glycine max*, e no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com virideplantae.

A quantificação relativa foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$, uma modificação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK, 2001), e o acúmulo dos transcritos de cada gene foi normalizada tomando como referência a expressão constitutiva dos genes Gm β -actin e GmRNAr18S (STOLF-MOREIRA, LEMOS, *et al.*, 2011). As reações de amplificação continham 90 ng de cDNA, 10,0 µL de 2X SYBR® *Green Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e *primers* na concentração de 200 nM. As condições de amplificação foram: duas etapas iniciais (50 °C por 2 min e 95 °C por 10 min) e 40 ciclos a 95 °C por 30 s e 60 °C por 30 s. A curva de dissociação foi verificada após a amplificação para certificar que apenas um único *amplicon* havia sido produzido em cada reação. As reações foram realizadas no termociclador SDS ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amostras foram analisadas em triplicata. Posteriormente foram realizadas as análises pela ANOVA para todas as variáveis respostas. Os métodos foram analisados utilizando-se o

programa SAS (“Statistical Analysis System”) versão 8.0 e as diferenças das médias dos níveis de estresse comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Tabela 1. Lista de *primers* usados no q RT-PCR para a avaliação da expressão diferencial dos genes do genótipo suprema submetida à condições de déficit hídrico.

PROTEÍNA	Número de acesso no site	Orgão	Primer forward 5'-3'	Primer reverse 5'-3'
Gm β -Actina [Glycine max]	GI:1498333	folha/raiz	GAGCTATGAATTGCCTGATGG	CGTITCATGAATCCAGTAGC
GmRNAr18S [Glycine max]	GI:18729	folha/raiz	AAACGGCTACCACATCCAAG	CCTTCAATGGATCCATCGTTA
Ascorbato Peroxidase [Glycine max]	gil351726325I	folha	CTTGACATCGCTGTTAGGCT	TCCAGGATGGAAGGGAACCTT
Glutamina sintetase [Glycine max]	gil13877511I	folha	AGACAGCAAGCATCAACACA	CTCTCCACACGGATTGAG
Complexo de evolução do oxigênio 2 [Glycine max]	gil356567470I	folha	AGCAACAGTGAAAGATGGCA	TTGCTGTGCTCTCCACAAAT
Transcetilase [Glycine max]	gil356576867I	folha	TCAACCGTGACCGTTTCATT	GTCATAGCCTGCAAGGTGAA
Ferredoxina-NADP redutase [Glycine max]	gil356559282I	folha	TTTTGGGTGTCCTACAAGC	CCGTCTCGTTTGTGTTGCTC
Anidrase carbônica [Glycine max]	gil356571334I	folha	CCTCTTCCATTACGGGTGG	GACAGAAGGGCCTAATGTGG
Metalendoproteína [Glycine max]	gil351724817I	folha	GTTTGGCATGATCTCGGACT	CGCGCTTTTGAAGTGTGATC
Rieske [Glycine max]	gil356549980I	folha	GACCTGCTCCATTGTCTCTG	AGGAACAACACGACCTTCC
Proteína do sistema coletor de luz - Lhc3 [Glycine max]	gil356554088I	folha	ACCCACTTGGCTTTGGTAAG	TTGCCAACATAGCCCAACCTT
Quinona oxidoreductase [Glycine max]	gil363808268I	folha	TACTCTCTACTGATGGGGCG	GGCTTCAGCTTACCACTCTC
Abscisic stress ripening protein [Glycine max]	gil351722069I	folha	ACAACACATCATATCCAAGCC	TGGCTTGTGTAACAGAGAT
Aldo-keto redutase [Glycine max]	gil356504240I	folha	CCAGCAGCTCTCAAAAGTGA	TGCTTGTGCTTCCCAATC
Fosfoglicerato cinase [Glycine max]	gil356557028I	folha	GGTTGTCAAGGCTGAAGACA	CATCTGGAAGAGAAGCCACC
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase [Glycine max]	gil356561064I	folha	GACCTCGTTGTTCAAGTCTC	GCTCATCACACAGAGAGG
Deidrina [Glycine max]	gil359807014I	folha	GACTTTGACCTTGGCCTCAA	CACGAGCTTTGCAGATTTGG
Ferritina-4 [Glycine max]	gil351724189I	raiz	CGAAGAGGTGAAGAAGGAGC	GTTAACGGCGGACTCAGATT
Isoflavona redutase [Glycine max]	gil356538212I	raiz	ACTGAGCCAGTCAGAGAAGT	AACCAGTAAAGCATGGCAA
Flavoproteína WrbA [Glycine max]	gil356549433I	raiz	GCAGGGTTCTTCTCTAGCAC	GGTGAACAAGCTGAGTGACA
Peroxidase [Glycine max]	gil356555869I	raiz	ACTACCCTCTCACAAGCACT	CTCCGAAGCAAGCCATTTTG
Inibidor Subtilisin da α -amilase [Glycine max]	gil356556646I	raiz	CTTACCTTTGTGGTGTGGCT	TATTGGGCTAGGACGATGT
3R-Hidromiristoil - ACP desidratase [Glycine max]	gil356558645I	raiz	TGGAGGTGAAGTTGTGTGTG	ATTCACTCCCCATTGCCATC
Fosfoglicerato mutaseindependente da 2,3-bisfosfoglicetato [Glycine max]	gil356568270I	raiz	TGGGTAGCTCAGGTTTCTCA	TCCAATTACACAACAGCCAC

Determinação dos conteúdos de óleo e proteína

A determinação da concentração de óleo total nas sementes em desenvolvimento foi realizada utilizando aparelho extrator de Soxhlet e éter de petróleo como solvente, segundo os procedimentos descritos em Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (Lutz, 1985). Os resultados foram expressos com base na matéria seca, obtida pela secagem em estufa a 105° C, por 24 horas.

Para determinação de proteínas totais, foi utilizado o método de Kjeldahl, descrito pela *Association of Official Analytical Chemists* (1992), com modificações. O conteúdo de proteína e óleo nas sementes também foi determinado em um espectrômetro infravermelho FT-NIR (Antaris II FT-NIR Analyzer Thermo Scientific). As sementes foram trituradas em um moinho para proporcionar granulometria adequada para a leitura do espectro no equipamento FT-NIR.

As diferenças entre os tratamentos foram estatisticamente diferentes segundo t-test de Student's ($p < 0.05$) realizado pelo software Genes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Status hídrico, trocas gasosas e parâmetros de fluorescência da clorofila *a*

As plantas do genótipo Suprema de *Glycine max* foram submetidas as condições de plena irrigação e não irrigadas (Figura 1). Nas plantas controle (irrigadas) o potencial hídrico foliar foi sempre superior à -0.05 MPa, ao passo que em plantas não irrigadas o potencial hídrico alcançou valores médios de - 1,75 MPa, momento em que foram coletados folhas e raízes para as posteriores análises. Através do perfil temporal do potencial hídrico foliar na antemanhã foi possível observar que o genótipo suprema alcançou o potencial hídrico em torno de -1,5 MPa por volta do vigésimo segundo dia após a imposição das condições de déficit hídrico, e ainda apresentou uma intensa murcha foliar neste período final (Figura 2).

A variação fotossintética e respiratória da soja ocorre de acordo com seu desenvolvimento, devido à alteração na força dreno, na arquitetura e estrutura foliar. No estagio reprodutivo durante o período de enchimento de grãos (R5) os valores de fotossíntese líquida (A) variaram entre 23.4 e 14 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ em condições de plena irrigação, e podem apresentar um declínio entre 4 e 10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dependendo do período de déficit hídrico em que se encontram (Nakayama et al., 2009; Kaschuk et al., 2010). A imposição do déficit hídrico resultou na redução de 1/3 nos valores de fotossíntese líquida em plantas não-irrigadas quando comparadas as plantas irrigadas (Tabela 2). Essa variação da taxa fotossintética foi acompanhada da redução de 1/5 na condutância estomática em plantas não-irrigadas (Tabela 2).

Em condições de déficit hídrico, inicialmente, para evitar uma desidratação excessiva ocorre o fechamento estomático, e em paralelo haverá menos influxo de CO_2 para o cloroplasto, condição esta em que a fotossíntese é limitada pela baixa disponibilidade de CO_2 . A partir de meus resultados, observamos que a razão C_i/C_a em condições irrigadas não se apresentou estatisticamente diferente do que em condições não-irrigadas (Tabela 2). Uma vez que a concentração de C_i interno não está diminuindo, além de estar ocorrendo uma redução na fixação de CO_2 , temos indicativo de que deve estar havendo também um comprometimento da maquinaria bioquímica ou fotoquímica de fixação do CO_2 no cloroplasto, visto que os valores de carbono interno permanecem os mesmos. Portanto, tal resultado

evidência que além de limitações estomáticas, estariam ocorrendo limitações bioquímicas.



Figura 1. Plantas de soja da variedade Suprema submetidas ao déficit hídrico no estágio R5 em comparação com o controle.

O funcionamento do fotossistema II (PSII) é um indicador muito sensível para estresses em plantas (Ball *et al.*, 1994), e em nosso trabalho foi observado que o rendimento quântico do transporte de elétrons no fotossistema II (ϕPSII) apresentou um declínio sob condições de déficit hídrico (Tabela 2). A ocorrência de fotoinibição crônica pode ser analisada via medição da razão entre a fluorescência máxima e fluorescência mínima (F_V/F_M) na antemanhã (Ishida *et al.*, 1999). Um ligeiro declínio de F_V/F_M foi observado sob condições de déficit hídrico, mas os valores ainda assim continuaram dentro do limite considerado como ótimo (~ 0.800), indicando a não ocorrência de fotoinibição. No genótipo suprema, a redução no ϕPSII acompanhado de valores inalterados da razão F_V/F_M está provavelmente associado com a inibição do fotossistema II durante a fotossíntese.

O coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) mostrou-se inalterado sob condições de déficit hídrico, ao passo que, uma redução no coeficiente de quenching fotoquímico (q_p), o aumento na fração da energia absorvida não utilizada na fase fotoquímica nem dissipada termicamente (PE) foram observados em condições não-irrigadas.

Na presença de déficit hídrico ocorreu a redução na taxa de transporte de elétrons (*ETR*) (Tabela 2) que pode estar relacionada com a ocorrência de uma modulação na expressão de proteínas dos fotossistemas para reduzir a captação de energia, pois um eficiente controle dos mecanismos fotoquímicos, não-fotoquímicos e ajustamento na partição do fluxo de elétrons em processos assimilativos e não-assimilativos minimizam os danos nos fotossistemas (Franco; Luttge, 2002). Se analisarmos a razão entre a taxa de transporte de elétrons sobre a fotossíntese líquida, podemos inferir que o déficit hídrico causou um aumento nesta razão, e assim, podemos supor um deslocamento desta energia para outras reações, uma vez que também foi observado uma redução no q_p e aumento do P_E (Tabela 2).

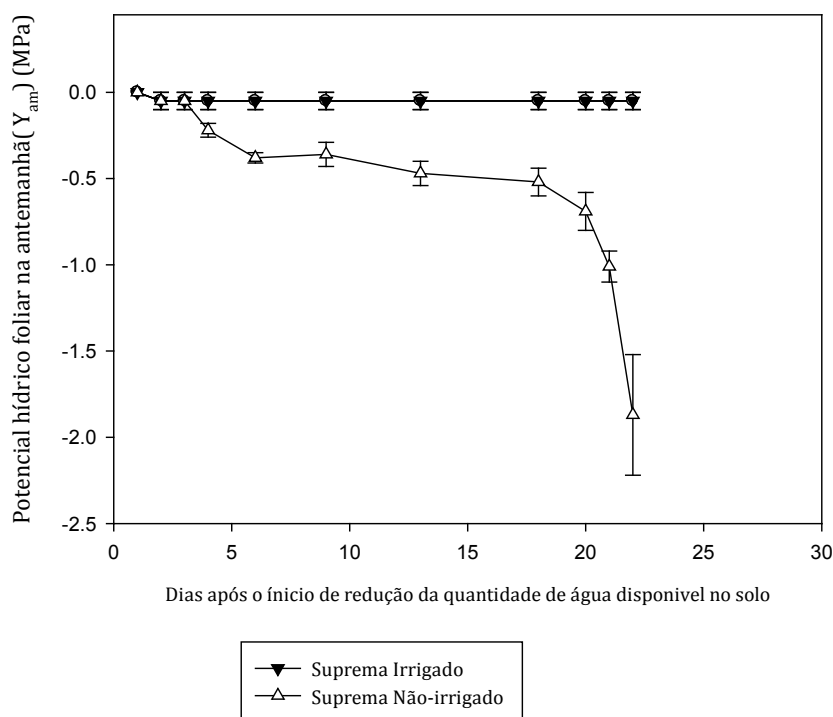


Figura 2. Perfil temporal do potencial hídrico foliar na antemanhã da variedade Suprema submetida ao déficit hídrico. Os pontos representam a média + erro padrão (n=6, onde n representa o número de plantas. I = irrigado, NI = não-irrigado).

Tabela 2. Efeito do potencial hídrico foliar na antemanhã (Ψ_H – 1,5 MPa) sobre parâmetros fisiológicos da variedade Suprema submetida às condições de déficit hídrico durante estágio reprodutivo (R4-R5). Taxa fotossintética (A) ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (gs) ($\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), razão entre concentração CO_2 interno e ambiente (C_i/C_a), Eficiência fotoquímica máxima do PSII (Fv/Fm), rendimento quântico do transporte de elétrons no PSII (ϕPSII), coeficiente de quenching fotoquímico (q_p), fração da energia absorvida não utilizada na fase fotoquímica nem dissipada termicamente (PE), taxa de transporte de elétrons (ETR) e coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão (n=10, onde n representa o número de plantas). As medições foram realizadas em folhas dos ramos medianos.

Parâmetros	SUPREMA		
	Irigado	Não-irrigado	
Ψ_H	-0.05 $\pm$ 2.31E-18	-1.75 $\pm$ 0.13	**
A	13.44 $\pm$ 1.83	4.73 $\pm$ 0.84	**
gs	230.92 $\pm$ 36.44	42.43 $\pm$ 7.87	**
C_i/C_a	0.70 $\pm$ 0.03	0.64 $\pm$ 0.06	ns
Fv/Fm	0.83 $\pm$ 0.003	0.80 $\pm$ 0.009	ns
ϕPSII	0.26 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.01	**
q_p	0.42 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.02	**
Pe	0.36 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.02	*
ETR	119.50 $\pm$ 11.19	76.08 $\pm$ 6.14	**
NPQ	1.95 $\pm$ 0.15	1.83 $\pm$ 0.19	ns

Asterisco denota diferenças significativas, segundo teste Tukey (**P< 0.01 ou *P<0.05, ns – não significativo)

Análise do proteoma diferencial em folhas e raízes do genótipo Suprema por espectrometria de massa

Na análise do proteoma diferencial de folhas do genótipo Suprema por eletroforese bidimensional foram encontrados 36 spots diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico. Destes, 25 foram identificados por espectrometria de massas no modo MS/MS. Foram analisadas também raízes do mesmo genótipo, onde foram encontrados 71 spots diferencialmente expressos, dos quais 38 foram identificados por espectrometria de massas no modo MS/MS (Tabela 3). Dentro os spots identificados estão aqueles que têm a correspondência entre as repetições dentro do mesmo tratamento e entre diferentes tratamentos, e os que somente aparecem em uma condição, controle ou tratado. As Figuras 2 e 3

mostram o perfil de proteínas de folhas e raízes, respectivamente, no genótipo Suprema quando submetidos às condições irrigadas e não-irrigadas (déficit hídrico) durante o período reprodutivo R4-R5.

A Tabela 3 contém os dados referentes à abundância relativa de cada spot em condições irrigadas (controle) e não irrigadas (tratado). A Tabela 4 mostra a identificação dos spots indicados nas Figuras 3 e 4 através da espectrometria de massas através de MASCOT MS/MS *ion search*, assim como apresenta também outros dados como o número de acesso no *National Center for Biotechnology Information*, ponto isoelétrico teórico e massa teórica determinadas no *Protein Prospector*, ponto isoelétrico experimental e massa experimental determinada pelo *Image Master 2D Platinum* e porcentagem de cobertura obtida no software *Scaffold* (Proteome Software, Inc., Portugal, OR).

Heat-shock-Proteins (HSPs)

Observou-se um aumento na expressão da HSP 70 e HSP 18.5 em folhas (spots 1, 33) e HSP 70, HSP 18.5 e HSP 18.2 em raízes (spots 75, 76, 86, 87, 103, 112) (Figura 3 e 4; Tabela 3). De forma similar as HSPs são descritas como um grupo de proteínas que são induzidas em condições de estresse com a função de proteção e reparo dos danos causados (Liu *et al.*, 2007; SU; LI, 2008; Sato;Yokoya, 2008). As HSP 70 são requeridas para o fechamento estomático e ainda para as respostas transcrpcionais e fisiológicas moduladas pelo ácido abscísico (ABA) (Clement *et al.*, 2011). O aumento na expressão de HSP70 pode estar associada, então, com a redução na condutância estomática observada em condições de déficit hídrico (Tabela 2).

As HSPs são chaperones divididas de acordo com homologia e peso molecular e encontram-se localizadas em compartimentos subcelulares como citossol, retículo endoplasmático, plastídeos e mitocôndrias (Sung; Guy, 2003). As *Small-Heat-Shock-Proteins* (sHSPs), especificamente, são chaperonas que apresentam massa molecular menor que 30 KDa (Waters, 1995).

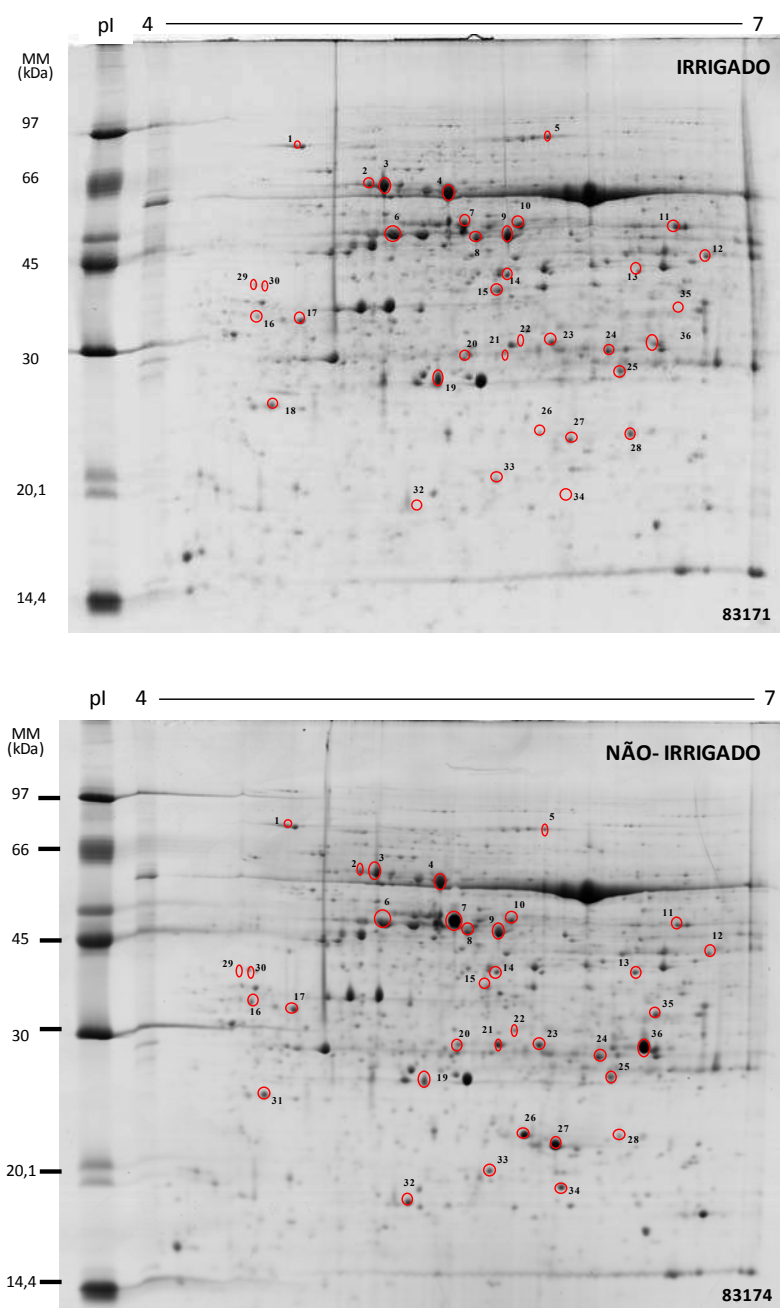


Figura 3. Perfil de proteínas de folhas na variedade Suprema submetidas às condições de déficit hídrico no período reprodutivo (R4-R5). Proteínas com expressão diferencial estão circuladas em vermelho e identificadas com número correspondente. Foram utilizados 1000µg de proteínas para a eletroforese bidimensional. As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7 para posterior separação por SDS-PAGE, e assim coradas com azul de coomassie para proceder a análise diferencial no software *Image Master 2D platinum*.

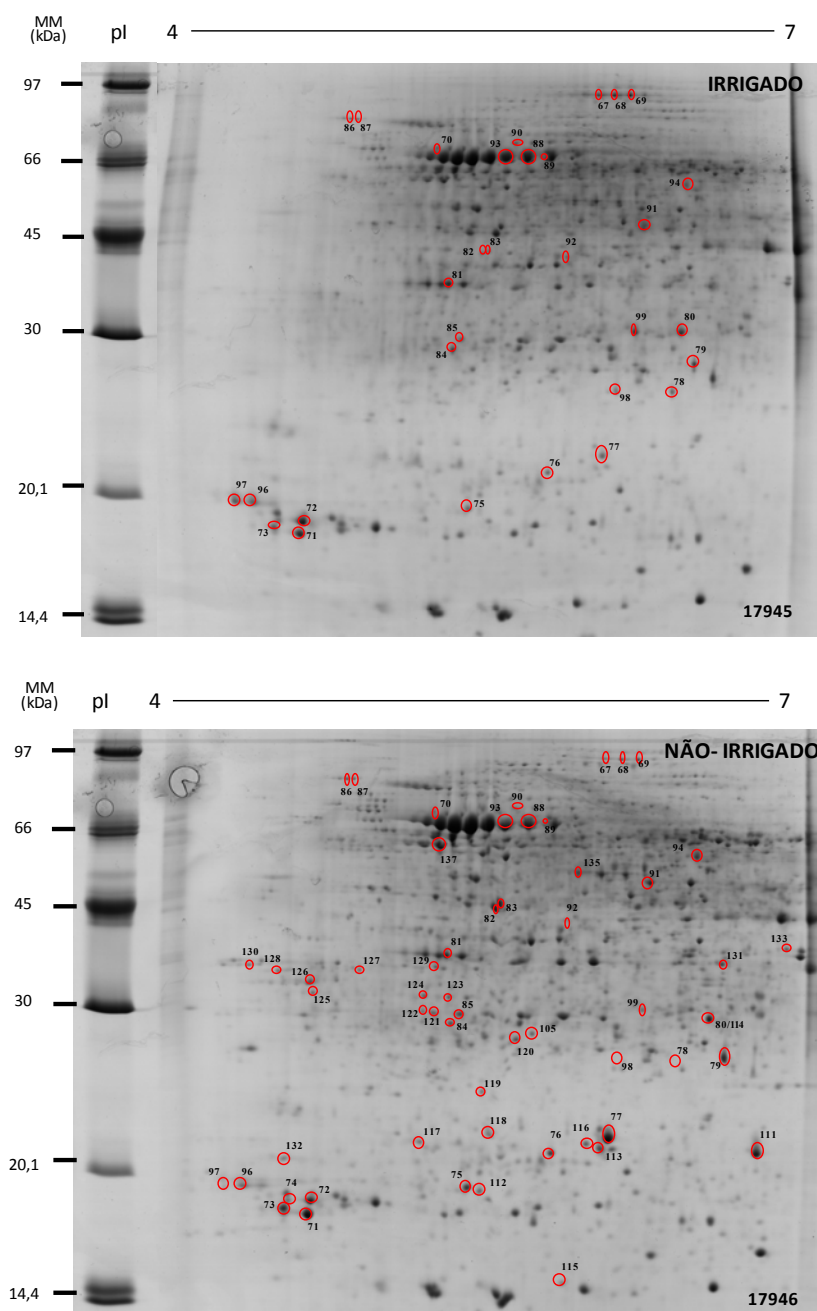


Figura 4. Perfil de proteínas de raízes na variedade Suprema submetida às condições de déficit hídrico no período reprodutivo (R4-R5). Proteínas com expressão diferencial estão circuladas em vermelho e identificadas com número correspondente. Foi utilizado 1000µg de proteínas para a eletroforese bidimensional. As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH4-7 para posterior separação por SDS-PAGE, e assim coradas com azul de coomassie para proceder a análise diferencial no software *Image Master 2D platinum*.

Existem evidências de que a HSP 70 encontrada no estroma dos cloroplastos participem na fotoproteção e no reparo do fotossistema II durante e depois da fotoinibição (Schroda *et al.*, 1999). As chaperonas estão envolvidas em etapas de processamento protéico, transporte através da membrana, modulação da atividade de algumas proteínas e ainda prevenção de agregação irreversível de algumas proteínas. São expressas em resposta à ativação da via de sinalização *Unfolded Protein Response* (UPR) que é ativada pela acumulação de proteínas mal-dobradas no retículo endoplasmáticos (Horváth *et al.*, 2008). Portanto, a expressão diferencial desta proteína está relacionada com a manutenção da homeostase celular frente às condições de déficit hídrico.

ATP sintase

Localizadas na membrana tilacoidal, as subunidades alfa e beta da ATP sintase cloroplastídica (spot 2, 3, 4) apresentaram redução na expressão relativa quando submetidas ao déficit hídrico (Figura 3, Tabela 3), sendo preferencialmente danificadas em relação a outras subunidades conforme previamente relatado (Teraza *et al.*, 1999; Flexas, 2002; Mahler *et al.*, 2007). A ATP sintase encontrada nos cloroplastos é responsável pela produção de ATPs que serão utilizados no ciclo de Calvin-Benson durante a fotossíntese (Yamori *et al.*, 2011), sendo, portanto a redução da síntese de ATP nessas condições um grande impedimento para fixação de carbono. A redução desta na expressão desta proteína remete aos dados fisiológicos nos quais foi verificada a redução de 1/3 nos valores de fotossíntese líquida quando o genótipo suprema foi submetido ao déficit hídrico (Tabela 2). A expressão de proteínas envolvidas no balanço energético em plantas é alterada em resposta às condições de déficit hídrico, principalmente porque os fatores transcricionais são regulados por sinais gerados pelos estresses abióticos como ácido abscísico, estado redox, e ainda conteúdo de ATP/NADPH (Lawlor; Teraza, 2009).

Entretanto, uma grande demanda por ATP respiratório em condições de estresse hídrico, para compensar as baixas taxas de produção de ATP nos cloroplastos, pode ser requerida para suportar os mecanismos de reparo (Flexas *et al.*, 2005). Neste estudo, as subunidades beta e delta da ATP sintase (spot 117,137) em raízes tiveram um aumento na expressão relativa frente às condições não

irrigadas (Figura 4 e Tabela 3). Por outro lado, também já foi observado em raízes que a exposição a estresses hídricos resulta em um declínio da taxa respiratória (Bryla et al., 1997). Soares (2008) mostrou em raízes de *Coffea canephora*, em condições de déficit hídrico, que aumento na expressão de proteínas glicolíticas e do ciclo de Krebs indicam um papel importante da respiração como mecanismo de drenagem de excesso de poder redutor quando ocorre uma redução da fotossíntese líquida. Experimentos investigando o papel da respiração em folhas e raízes de plantas submetidas ao estresse salino mostraram que a respiração apresenta uma redução em folhas e um aumento em raízes quando submetidas ao estresse (Jacoby et al., 2013). Portanto, não existe ainda um consenso sobre como as taxas de respiração variam em resposta ao aumento da severidade de estresse (Ribas-carbo et al. 2005; Galmes et al. 2007; Slot et al. 2008; Chaves et al. 2003; Flexas et al. 2005, 2006; Atkin; Macherel 2009; Parker et al., 2006; Wang et al., 2008)

Transcetolase

Foi observado redução na expressão da enzima (spot 5) transcetolase quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico (Figura 3 e Tabela 3). Esta enzima cataliza a transferência de unidades de carbono da Frutose-6-fosfato ou sedoheptulose-7-fosfato para o Gliceraldeído-3-fosfato, participando na regeneração da ribulose 1,5-bisfosfato, eritrose-4-fosfato ou ribose-5-fosfato nas etapas do ciclo de Calvin-Benson, ou na posição inversa na caso da via das pentoses fosfatadas. Uma transcetolase cloroplástidica apresentou redução sobre condições de déficit hídrico (Ahmed *et al.*, 2013). Juntamente com outras enzimas pertencentes ao ciclo de Calvin-Benson que apresentam regulação mediada por tioredoxinas, existem evidências de uma regulação oxidativa em transcetolases (Koller *et al.*, 2003). Em experimentos com cloroplastos intactos e análise da fixação de CO₂ foi mostrado que esta enzima é sensível às espécies reativas de oxigênio (Kaiser, 1979). Portanto, a redução na expressão desta proteína pode estar relacionada com a regulação negativa de enzimas envolvidas no ciclo de Calvin onde ela se apresenta como uma etapa limitante, como também o metabolismo de carboidratos.

Rubisco Activase

A redução da expressão da rubisco ativase (spot 6) foi detectado em plantas não-irrigadas (Figura 3 e Tabela 3). Em condições severas de seca, a redução desta proteína foi observada em uma variedade de arroz tolerante á seca (Ji *et al.*, 2012). A enzima Rubisco ativase, através da utilização de energia na forma de ATP, promove a remoção de açúcares fosfatados que inibem a atividade da proteína rubisco, permitindo que a carbamilação espontânea pelo CO₂ ocorra no sitio ativo desta proteína, uma função essencial para a fotossíntese (Hammond *et al.*, 1998). Além de também ter sido relatada com a função de chaperona durante estresses abióticos (Portis, 2003). A redução na expressão desta proteína foi reportada em cultivares de soja sob condições de estresse salino (Sobhanian *et al.*, 2010), assim como declínios na expressão e atividade desta enzima têm sido associados com a inibição da fotossíntese sob condições de estresses em várias espécies (Wang; Huang, 2010; Lawlor; Teraza, 2009), explicando assim a redução na expressão relativa detectada em nossos experimentos.

Glutamina Sintetase

Nossos resultados detectaram duas isoformas desta proteína, sendo que na primeira (spot 7) foi observado um aumento na porcentagem em volume, já na segunda foi observado uma redução (spot 10), ambas frente às condições de déficit hídrico (Figura 3 e Tabela 3). A enzima Glutamina sintetase (GS; EC 6.3.1.2) é uma enzima chave no metabolismo de nitrogênio catalisando, através do uso de moléculas de ATP, a condensação de amônio e glutamato em glutamina (Cánovas *et al.*, 1998), além de ocupar um papel importante na regulação nos níveis de prolina, um osmoprotetor.

Em angiospermas, duas isoformas de GS, a GS1 localizada no citossol e a GS2, no cloroplasto (Edwards *et al.*, 1990) são presentes. As funções fisiológicas distintas de GS1 e GS2 são baseadas na sua distribuição órgão-específica. A GS1 citosólica está localizada no tecido vascular e desempenha um importante papel na assimilação de amônio, derivado da fixação de nitrogênio e outras fontes de nitrogênio, e da remobilização de nitrogênio durante a senescência (Teixeira *et al.*, 2005; Tabuchi *et al.*, 2007), desempenhando uma importante função na assimilação primária de nitrogênio nas raízes, com a função de gerar glutamina

para ser transportada pelo floema, sendo composta por múltiplos genes homólogos, porém distintos (Cánovas et al., 2007; Hirel et al., 2007). Mesquita (2013) observou o aumento dos níveis de alguns metabólitos em folhas sob estresse hídrico, e entre eles o aminoácido glutamina. Hongmei *et al.* (2009) mostraram em plantas superexpressando GS1 um aumento no conteúdo de aminoácidos totais e nitrogênio em toda a planta aliado a uma maior tolerância à seca. Neste sentido, a partir de meus resultados onde foi verificado o aumento no conteúdo de proteínas nas sementes (Figura 7) destaca-se a função de GS em fixar nitrogênio em aminoácidos, sendo que estes podem ser transportados para tecidos e órgãos em desenvolvimento, como as sementes. O aumento na concentração de nitrogênio nas sementes foi observado por Habash e colaboradores (2001) em plantas supreexpressando GS1 nas folhas, confirmando nossos resultados. A glutamina é um aminoácido usado por transaminases para a síntese de outros aminoácidos, fato este que explica a expressão elevada desta proteína em condições de déficit hídrico em meu trabalho, cerca de 10 vezes maior que em condições controle (Tabela 3).

A outra isoforma, a GS2 cloroplastídica, é responsável pela reassimilação de amônio derivado da fotorespiração, sendo codificadas por um único gene nuclear (Zozaya-Garza;Sengupta-Gopalan, 1999; Orea *et al.*, 2002); ressalte-se, no entanto, que sua presença em tecidos não-fotossintetisantes já foi reportada (Woodall; Forde, 1996; Melo *et al.*, 2003). A re-fixação da amônia consome muita energia, e requer duas enzimas localizadas no cloroplasto, a glutamina sintetase e a ferredoxina dependente da glutamato sintase (Fd-GOGAT) (Bauwe et al., 2010). A redução na expressão desta isoforma, GS2, seria uma regulação negativa relacionada ao consumo de energia frente às condições de déficit hídrico.

Fosfoglicerato cinase (PGK)

A enzima Fosfoglicerato cinase (spot 8 e 9) mostrou uma redução na expressão quando as plantas estavam em condições de déficit hídrico (Figura 3 e Tabela 3). Entre as reações fotossintéticas no cloroplasto, a Fosfoglicerato cinase catalisa a fosforilação do 3-fosfoglicerato, produzindo 1,3-bisfosfoglicerato e ADP, como parte das reações, regenerando a ribulose-1,5-bisfosfato. Em resposta às condições de déficit hídrico um declínio geral em proteínas correspondentes as

enzimas fotossintéticas e do metabolismo de carboidratos são observadas, como a enzima fofoglicerato cinase, sugerindo uma inibição do metabolismo energético (Castillejo *et al.*, 2008; Nanjo *et al.*, 2010), em concordância com meus resultados ora apresentados.

Gliceraldeído-3- Fosfato desidrogenase A

A redução de uma gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (spot11) foi observada em plantas não irrigadas (Figura 3 e Tabela 3). Outros trabalhos também observaram esta redução nas mesmas condições (Sobhanian *et al.*, 2010; Durand *et al.*, 2011).

A interconversão de 1,3-bisfosfoglicerato e gliceraldeído 3-fosfato é catalizada pela enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), uma etapa dependente de NAD(P) tanto na glicólise quanto no ciclo de Calvin-Benson, sendo esta reação um importante centro de integração de sinal entre reações de redução-oxidação (Sparla *et al.*, 2005). Algumas funções não glicolíticas, como regulação da transcrição e apoptose, tem sido atribuídas às enzimas glicolíticas, onde funções adicionais sugerem uma ligação com sensores metabólicos (Kim; Dang, 2005; Hara; Snyder, 2006; Colell *et al.*, 2007). Uma família de quatro genes que condicam GAPDHs (GAPC1, GAPC2, GAPCp1 e GAPCp2) está presente em *Arabidopsis thaliana*, sendo GAPC1 e 2 isoformas citossólicas, enquanto GAPCp1 e GAPCp2 estão localizadas nos plastídeos (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2009).

Sabe-se ainda que a deficiência de GAPCp afeta a via de biossíntese de ABA, pois o substrato de GAPCp, Gliceraldeído-3-fosfato, é o primeiro precursor da via do metil-eritrol fosfato que é responsável pela biossíntese de ABA nos plastídeos (Muñoz-Bertomeu *et al.*, 2011). A redução nesta proteína pode estar relacionada com a redução do metabolismo energético em condições de déficit hídrico, ou com outras funções não glicolíticas citadas acima.

Quinona oxidoreductase

Duas quinonas oxidoreductases foram encontradas (spot 13; spot 108) e tiveram sua expressão relativa aumentada sob condições de déficit hídrico (Figura 3 e Tabela 3), assim como em outros trabalhos da literatura (Nouri; Komatsu, 2010; Castillejo *et al.*, 2008). As enzimas quinonas oxidoreductases (EC 1.6.99.2) tem a função de oxidar as proteínas quinonas que são carreadores móveis de

elétrons dentro da fase lipídica da membrana das cadeias de transporte de elétrons nas reações da fotossíntese e respiração (Cramer *et al.*, 1991). A função destas proteínas é essencial para acoplamento quimio-osmótico, permitindo duas etapas de transferência de elétrons, prevenindo a célula de danos causados pela formação de radicais livres (Ban *et al.*, 1992). O aumento na expressão destas proteínas pode estar relacionado a função de proteção contra o estresse oxidativo gerado em estresses hídricos.

O pool de plastoquinonas é um eixo regulatório que controla tanto a eficiência do transporte de elétrons e a ativação da expressão gênica. As plastoquinonas oxidadas também controlam a regulação pós-traducional de enzimas fotossintéticas pela fosforilação e também a taxa de transcrição de genes que codificam proteínas dos centros de reação dos fotossistemas (Foyer *et al.*, 2012). Portanto, mesmo ocorrendo uma redução de ETR, em meu trabalho, em condições de déficit hídrico (Tabela 2), o aumento destas isoformas de plastoquinonas não estaria relacionado a uma função de transporte de elétrons, e sim, com a regulação de proteínas envolvidas na fotossíntese e respiração.

Ferredoxina NADP-redutase

A redução na expressão da enzima Ferredoxinas NADP-redutases (spot 15) (FNRs, EC 1.18.1.2) foi observada em plantas não irrigadas (Figura 3 e Tabela 3). São enzimas hidrofílicas e monoméricas que contêm como grupo prostético por ligação não-covalente uma flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD), catalisando a transferência de elétrons da ferredoxina, reduzida pelo Fotossistema I, para o NADP⁺, provendo o NADPH necessário para as etapas de assimilação de dióxido de carbono (Shin; Arnon, 1965). Estas enzimas também participam na transferência de elétrons de outros processos metabólicos como a fixação de nitrogênio, biossíntese de isoprenóides, detoxificação xenobiótica, resposta a estresses oxidativos e biogênese de grupamentos ferro-enxofre (Carrillo; Ceccarelli, 2003; Ceccarelli *et al.*, 2004; Medina; Gomez-Moreno, 2004; Seeber *et al.*, 2005).

Vários trabalhos relatam sua importância como enzimas antioxidantes envolvidas na reutilização de radicais livres em plantas, e na manutenção da homeostase celular em condições de estresses ambientais (Palatnik, 1997; Rodriguez *et al.*, 2007; Valderrama *et al.*, 2006). Contudo, sua redução foi relatada

em alguns trabalhos sob condições de déficit hídrico (Xiaoa *et al.*, 2009; Durand *et al.*, 2011), corroborando com o encontrado em meu trabalho. O transporte de elétrons cíclico no fotossistema I é desempenhado pela FNR e portanto a redução na taxa de transporte de elétrons observado (tabela 2) está relacionado com a redução na expressão desta proteína (Tabela 3).

Plastid-lipid-associated protein

O aumento na expressão de duas isoformas da proteína fibrilina (spot 16; spot17) foi detectada em plantas não-irrigadas (Figura 3 e Tabela 3). Assim como o encontrado em nossos resultados, outros autores mostraram também que esta proteína exibe um acúmulo em condições de estresse (Chen *et al.*, 1998; Gillet *et al.*, 1998; Leitner-Dagan *et al.*, 2006; Durand *et al.*, 2011).

As fibrilinas, também chamadas de *Plastid lipid-associated proteins*, são encontradas em plantas em estruturas chamadas plastoglobulos dentro de cloroplastos. Alguns trabalhos encontraram fibrilinas exclusivamente associadas à plastoglobulos e suas zonas de conexão em várias espécies de plantas (Austin *et al.*, 2006; Vidi *et al.*, 2006; Ytterberg *et al.*, 2006). Foi demonstrado que o ABA induz a acumulação do gene FIB1, o qual é responsável por mediar alguns efeitos do ABA na fotoproteção, especialmente uma tolerância à fotoinibição do fotossistema II em *Arabidopsis*, e ainda pode estar relacionado com produção de ácido jasmônico relacionada à estresses no aparelho fotossintético (Yang *et al.*, 2006). E assim, trabalhos mais recentes, indicam que os plastoglobulos podem funcionar como uma plataforma especializada para síntese de precursores de ácido jasmônico, estocando triacilglicerol suficiente para realizar a síntese rapidamente após estresse oxidativo iniciar efeitos sobre a maquinaria fotossintética (Youssef *et al.*, 2010).

OOE 2 (Oxygen-evolving enhancer)

A redução de uma OOE2 (spot 19) foi observado em plantas não irrigadas (Figura 3 e Tabela 3). As principais proteínas do complexo de evolução do oxigênio são OOE1, OOE2 e OOE3, que codificam para genes nucleares PsbO, PsbP e PsbQ, respectivamente (Seidler, 1996). OOE2 tem um papel importante na evolução do oxigênio e na estabilidade do fotossistema II (Sugihara *et al.*, 2000). Em condições de déficit hídrico nossos resultados mostraram uma redução na porcentagem em

volume de OEE2, assim como outros trabalhos da literatura (Bazargani *et al.*, 2011; Kottapalli *et al.*, 2009). Este fato pode estar relacionado a um declínio geral em enzimas fotossintéticas e do metabolismo de carboidratos sugerindo uma inibição do metabolismo energético (Castillejo *et al.*, 2008; Nanjo *et al.*, 2010), como um todo.

Entretanto, em outros trabalhos observaram um aumento na expressão desta proteína (Chenping; Huang, 2010; Gazanchian *et al.*, 2007), que pode estar associado com a aceleração da dissociação destas proteínas do fotossistema II, sugerindo que danos neste sistema podem ter ocorrido (Chenping; Huang, 2010).

Peroxidases

As peroxidases (EC 1.11.1.x) são enzimas capazes de executar a reação na qual um peróxido é reduzido e um substrato é oxidado. Em plantas assumem papel fundamental em todos os tecidos, durante todo o ciclo de vida, tendo um papel fundamental no sistema antioxidativo. Estão divididas em classes e subclasses, sendo que a primeira divisão esta em dois conjuntos, heme peroxidases e as não-heme peroxidases. O grupo heme é composto por 6 subgrupos: Peroxidases Ciclooxygenase (Animal peroxidase); Catalase; Di-heme peroxidase; DyP-type peroxidase; Haloperoxidase; Não-animal peroxidases. E o grupo não-heme por: D-like peroxidase; Haloperoxidase; Catalase (Mn); NADH peroxidase, oxidase e dehidrogenase; Thiol peroxidases; NADPH oxidase (Oliva *et al.*, 2009). As não-animal peroxidases estão divididas em classe I, II e III. A classe I é composta por Citocromo c peroxidase (EC 1.11.1.5), catalase (EC 1.11.1.6) e ascorbato peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11), a classe II por Peroxidase dependente de magnésio (EC 1.11.1.13) e ligninase (EC 1.11.1.14), e por ultimo a classe III composta pela Peroxidase (POX) (EC 1.11.1.17).

Ascorbato Peroxidase 2 (APX2)

A enzima ascorbato peroxidase (spot 23) foi detectada somente em condições irrigadas (Figura 3 e Tabela 3). A APX (EC 1.11.1.11) cataliza a redução de peróxido de hidrogênio à água e tem uma grande especificidade e afinidade pelo ascorbato como redutor, sendo encontradas diferentes formas de APX nos cloroplastos, citosol, mitocôndria e glioxissomos (Shigeoka *et al.*, 2002). Tem papel importante na eliminação de peróxido de hidrogênio do cloroplasto e citosol,

resultando em uma tolerância a estresses bióticos e abióticos. Mittler e colaboradores (1994) reportaram que APX1 teve um aumento na expressão durante o estresse hídrico. Por outro lado, Wang e colaboradores (2007) mostraram que a atividade de APX em raízes diminuiu durante o estresse hídrico (Wang; Jiang, 2007; Mittler; Zilinskas, 1994). Os dois estudos sugerem que APX pode ter respostas fisiológicas diferentes para diferentes tipos de estresse. De qualquer forma, muitos grupos de pesquisas reportam que a expressão do gene APX, da proteína APX, ou a atividade de APX podem ser alterados por muitos estresses bióticos ou abióticos (Mittler; Zilinskas, 1994; Wang; Jiang, 2007; D'arcy-Lameta *et al.*, 2006).

Peroxidase-54 (Classe III peroxidase)

Duas isoformas da enzima Peroxidase (spot 94, 110) foram encontradas com a expressão aumentada em raízes de plantas submetidas às condições de déficit hídrico (Figura 4 e Tabela 3). A classe III peroxidase (PRX) são oxidoredutases envolvidas em vários processos fisiológicos como detoxificação celular, catabolismo de auxinas, lignificação, suberização, resposta ao estresse e senescência (Passardi *et al.*, 2005; Hirag *et al.*, 2001). Estas enzimas quando localizadas nas paredes celulares, tem a habilidade de clivar polissacarídeos tendo, portanto, um papel importante na regulação da formação da parede celular e no processo de expansão celular (Liszkay *et al.*, 2003; Passardi *et al.*, 2005).

Os estresses abióticos como o déficit hídrico causam uma forte restrição nos processos de alongamento e crescimento celular que diferem em intensidade entre os tecidos da parte aérea e do sistema radicular, e entre diferentes espécies de plantas (Bacon *et al.*, 1997; Wu; Cosgrove, 2000; Skirycz; Inze, 2010). Estes processos são fortemente modulados pela peroxidase classe III, peróxido de hidrogênio e ascorbato, localizados na parede celular e no apoplasto, formando uma barreira rígida e física que pode proteger as raízes de desidratação sob condições de déficit hídrico (Passardini *et al.*, 2004; Cosio; Durand, 2009).

Vários trabalhos observaram o aumento da expressão de peroxidases classe III sob condições de déficit hídrico assim como nos nossos resultados, mostrando a importância desta proteína na proteção contra a desidratação do sistema radicular (Jiang *et al.*, 2007; Degenhardt; Gimmler, 2000; Yoshimura, *et al.*, 2008).

2-Cys peroxiredoxin

Um aumento na expressão desta proteína (spot 31) foi observado em folhas de plantas submetidas às condições de déficit hídrico (Figura 3 e Tabela 3). Alguns trabalhos também mostraram resultado semelhante nas mesmas condições (Ali; Komatsu, 2006; König *et al.*, 2002; Hajheidari *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2012; Hajheidari *et al.*, 2007). As Cys peroxiredoxinas são peroxidases do tipo heme-peroxidase pertencentes ao grupo das thiol-peroxidases (Oliva *et al.*, 2009) que participam na proliferação celular, diferenciação, apoptose e fotossíntese (Caporaletti *et al.*, 2007). Foi demonstrado que as Prxs também podem atuar como chaperonas ou como reguladores do ciclo celular (Phalen *et al.*, 2006; Trotter *et al.*, 2008; König *et al.*, 2013). Outra função associada a esta enzima está relacionada a detoxificação celular na via de sinalização do peróxido de hidrogênio (Fourquet *et al.*, 2008; Stone; Yang, 2006; Veal *et al.*, 2007; Winterbourn, 2008), sendo assim, o aumento desta proteína em meu trabalho mostra que os mecanismos de dissipação do excesso de energia não devem estar sendo mais eficientes para drenar o excesso do poder redutor.

Glutathione S-transferase

A proteína Glutathione S-transferase (spot 105) teve sua expressão aumentada em raízes de plantas submetidas às condições de déficit hídrico (Figura 4 e Tabela 3). As GSTs participam na detoxificação direta interagindo com EROS, ou indiretamente participando da ativação de mecanismos de defesa e no envolvimento da sinalização celular (Mittler *et al.*, 2004; Pitzschke, 2006; May *et al.*, 1998; Foyer; Noctor, 2005). Na sinalização celular, a glutathione interage com EROs, tioredoxinas, glutaredoxinas, ácido salicílico, ABA, e ainda participa na regulação do crescimento, desenvolvimento, ciclo celular, expressão gênica, atividade protéica (Noctor; Foyer, 1998; Shao *et al.*, 2008).

Assim como o encontrado neste trabalho nas condições de déficit hídrico, a seca induz a expressão desta proteína em raízes em inúmeros trabalhos (Jiang *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2004; Anderson; Davis, 2004; Ji *et al.*, 2010; Kellos *et al.*, 2008; Xu; Huang, 2008; Haluskova *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013).

Anidrase carbônica

A enzima anidrase carbônica (spot 24) apresentou uma maior expressão em plantas que estavam em condições de déficit hídrico (Figura 3 e Tabela 3). A anidrase carbônica (EC 4.2.1.1) é uma enzima que catalisa a interconversão de dióxido de carbono (CO₂) e água em bicarbonato (HCO₃⁻), participando do transporte de carbono inorgânico para as células fotossintetizantes, ou para as células responsáveis pela respiração (Hewett-Emmett; Tashian, 1996). Esta enzima é codificada por cinco famílias gênicas distintas α , β , γ , δ , e ζ (Bertucci *et al.*, 2009). Semelhante ao observado em nossos resultados, relatos da literatura mostram que esta enzima exibe um aumento de sua expressão frente às condições de déficit hídrico também (Caruso *et al.*, 2008; Caruso *et al.*, 2009; Xing; Wu, 2012; Durand *et al.*, 2011). Entretanto, outro trabalho mostrou que em estresses moderados esta enzima apresentou uma redução na expressão, embora em estresses severos tenha apresentado um aumento da expressão no mesmo experimento (Kicheva; Lazova, 1997), evidenciando, portanto, resultados diferenciais de acordo com a intensidade do estresse aplicado. O aumento desta proteína pode estar contribuindo para mecanismos moleculares que governam uma melhor utilização de fontes disponíveis para sobreviver em condições de estresse hídrico.

Proteína Lhc (sistema de coleta de Luz do Fotossistema)

A redução de uma proteína Lhc3 (spot 25) sob condições de déficit hídrico (Figura 3 e Tabela 3) foi observada em meus resultados. O sistema coletor de luz (Lhc) faz parte do aparelho fotossintético das plantas, onde genes nucleares codificam dez tipos diferentes de proteínas Lhc, Lhc 1 a 4 e Lhc 1 a 6 (Jansson *et al.*, 1992; Price, 1994). O cloroplasto produz grande quantidade de espécies reativas de oxigênio quando as plantas estão sob condições de estresses como o déficit hídrico, causando danos nas membranas e nas clorofilas, podendo levar ao desenvolvimento de clorose foliar. Em vários trabalhos existem relatos de que a clorose foliar apresentada em condições de déficit hídrico é acompanhada por uma redução das proteínas envolvidas em reações fotossintéticas, como as proteínas do complexo coletor de luz (Lhc) (Agrawal *et al.*, 2002; Bohler *et al.*, 2007; Bohler *et al.*, 2010; Xu; Huang, 2010), o que explica a redução desta proteína em nossos resultados, aliando ainda tal resultado, aos nossos dados fisiológicos que mostram

uma redução no ϕ PSII acompanhado de valores inalterados da razão F_V/F_M , relacionando assim a uma inibição do fotossistema II durante a fotossíntese (Tabela 2).

Metaloendoproteinase (SMEP1/MMP)

Um metaloendoproteinase (spot 28) apresentou redução na expressão sob condições de déficit hídrico (Figura 3 e Tabela 3). Estas proteínas, também chamadas de matrix metaloendoproteinases (MMP), pertencem a uma família de endopeptidases envolvidas na remodelagem da matrix extracelular. São expressas durante o crescimento, desenvolvimento e em respostas à estresses bióticos e abióticos (Liu et al., 2001; Golldack et al., 2002; Combier *et al.*, 2007; Schiermeyer *et al.*, 2009). Algumas evidências mostraram que uma GmMMP2 pode ter um papel no mecanismo de defesa de plantas em casos de infecção por patógenos (Liu et al., 2001).

Deidrina (LEA-2 -Late embryogenesis abundant)

Em condições de déficit hídrico foi observado o aumento de duas isoformas de deidrinases (spot 29; spot 30) em folhas (Figura 3 e Tabela 3). Outros trabalhos também têm mostrado um aumento de deidrinases frente às condições de déficit hídrico (Salekdeh *et al.*, 2002; Shinozakik, 2007; Mowla et al., 2006; Rakwal; Komatsu, 2004; Ke *et al.*, 2009), corroborando com os nossos resultados.

Frente a vários estresses abióticos como seca, as plantas apresentam vários mecanismos para evitar a perda de água intracelular como o aumento na expressão das proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*) (Ashley, 1978). As LEAs estão contidas nos grupos 1, 2 e 3 (Bray, 1993). O grupo 2, onde as LEAs são chamadas de Deidrinases, tipicamente acumulam frente às condições de estresses abióticos como a seca (Wise; Tunnacliffe, 2004). A aumento na expressão destas proteínas em nosso trabalhos pode estar associada a estabilização de membranas, balanço redução-oxidação, antioxidação, ou ainda função de chaperones (Bray, 1993). Em outros trabalhos, com plantas submetidas a vários estresses relacionados a desidratação celular, foi demonstrado o aumento na expressão de deidrinases em vários tecidos vegetativos (Bray, 1997; Skiver; Mundy, 1990).

Tabela 3. Nível de expressão relativa das proteínas de folhas e raízes responsivas as condições de déficit hídrico ($\Psi_{pd} = -1,75$ MPa) na variedade Suprema durante o período reprodutivo (R4-R5).

Spot ⁽¹⁾	ID 2D platinum ⁽²⁾	Local	PROTEÍNA	Média % volume $\pm$ DP ⁽³⁾		Nível de expressão
				Irrigado	Não-irrigado	
1	599	folha	HSP 70 KDa - cloroplastídica	0.1150 $\pm$ 0.0014	0.1655 $\pm$ 0.0100	1.44
2	554	folha	ATP sintase - subunidade α	0.3242 $\pm$ 0.0217	0.1784 $\pm$ 0.0302	-1.82
3	553	folha	ATP sintase - subunidade α	1.7463 $\pm$ 0.2117	0.9163 $\pm$ 0.1423	-1.91
4	515	folha	ATP sintase - subunidade β CF1	3.1493 $\pm$ 0.3129	1.7590 $\pm$ 0.3382	-1.79
5	607	folha	Transcetolase	0.1930 $\pm$ 0.0374	0.0814 $\pm$ 0.0019	-2.37
6	456	folha	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	2.2142 $\pm$ 0.1933	1.3708 $\pm$ 0.1375	-1.62
7	469	folha	Glutamina sintetase	0.6605 $\pm$ 0.2386	6.8768 $\pm$ 1.1198	10.41
8	450	folha	Fosfoglicerato cinase	0.6502 $\pm$ 0.0188	0.4820 $\pm$ 0.0218	-1.35
9	448	folha	Fosfoglicerato cinase	1.8693 $\pm$ 0.2801	0.8745 $\pm$ 0.0353	-2.14
10	477	folha	Glutamina sintetase 2	0.3996 $\pm$ 0.0538	0.2178 $\pm$ 0.0020	-1.83
11	476	folha	Gliceraldeído-3-Fosfato desidrogenase A	0.2992 $\pm$ 0.0648	0.1229 $\pm$ 0.0085	-2.43
13	406	folha	NADPH:Quinona oxidoreductase	0.0793 $\pm$ 0.0069	0.1485 $\pm$ 0.0037	1.87
14	401	folha	unknown	0.1690 $\pm$ 0.0103	0.1227 $\pm$ 0.0032	-1.38
15	389	folha	Ferredoxina-NADP redutase 1	0.2135 $\pm$ 0.0112	0.1548 $\pm$ 0.0184	-1.38
16	369	folha	Fibrilina	0.0451 $\pm$ 0.0023	0.1072 $\pm$ 0.0018	2.37
17	367	folha	Fibrilina	0.2041 $\pm$ 0.0112	0.2437 $\pm$ 0.0036	1.19
19	326	folha	Oxygen-evolving enhancer protein 2	1.5092 $\pm$ 0.3654	0.4435 $\pm$ 0.1208	-3.40
23	1041	folha	L-ascorbato peroxidase 2	0.1556 $\pm$ 0.0163		n.a.
24	353	folha	Anidrase Carbonica	0.2384 $\pm$ 0.0075	0.3222 $\pm$ 0.0047	1.35
25	332	folha	Proteína Lhc3 (sistema de coleta de Luz do Fotossistema)	0.2288 $\pm$ 0.0343	0.1587	-1.44
28	317	folha	Metaloendoproteinase	0.1780 $\pm$ 0.0238	0.0580 $\pm$ 0.0169	-3.07
29	393	folha	Dehidrina /LEA-2 (Late embryogenesis abundant)	0.0244 $\pm$ 0.0012	0.0551 $\pm$ 0.0027	2.26
30	955	folha	Dehidrina /LEA-2 (Late embryogenesis abundant)		0.0382 $\pm$ 0.0039	n.a.
31	322	folha	2-Cys peroxidoxin (BAS1)	0.1679 $\pm$ 0.0166	0.2185 $\pm$ 0.0043	1.30
33	935	folha	sHSP 18.5 kDa		0.1357 $\pm$ 0.0062	n.a.
67	221	raiz	Lipoxigenase 9S	0.2210 $\pm$ 0.0561		n.a.
69	219	raiz	Lipoxigenase 9S	0.2612 $\pm$ 0.0485	0.1131 $\pm$ 0.0150	-2.31
75	28	raiz	sHSP	0.1559 $\pm$ 0.0067	0.3661 $\pm$ 0.0588	2.34
76	34	raiz	sHSP 18.5 kDa	0.1178 $\pm$ 0.0089	0.2503 $\pm$ 0.0333	2.12
78	38	raiz	Flavoproteína wrbA	0.1611 $\pm$ 0.0125	0.0777 $\pm$ 0.0093	-2.07
79	49	raiz	Chalcona isomerase	0.2418 $\pm$ 0.0166	0.1509 $\pm$ 0.0054	-1.60
80	65	raiz	Proteína de reserva vegetativa - VSP β (Precursor da Glicoproteína de 31 KDa do caule)	0.3643 $\pm$ 0.0289	0.1016 $\pm$ 0.0058	-3.58
82	104	raiz	Isoflavona redutase	0.0714 $\pm$ 0.0051		n.a.
84	54	raiz	Chalcona flavonona isomerase 1B-1	0.2193 $\pm$ 0.0185	0.1038 $\pm$ 0.0062	-2.11
86	211	raiz	HSP 70 KDa	0.0724 $\pm$ 0.0107		n.a.
87	210	raiz	HSP 70 KDa	0.0579 $\pm$ 0.0107		n.a.
90	196	raiz	Fosfoglicerato mutase(independente da 2,3-bifosfoglicetato)	0.1349 $\pm$ 0.0135	0.0859 $\pm$ 0.0114	-1.57
91	118	raiz	Alcool desidrogenase	0.3766 $\pm$ 0.0897		n.a.
92	103	raiz	Isoflavona redutase	0.0653 $\pm$ 0.0060		n.a.
94	145	raiz	Peroxidase 54kDa (classe III)	0.1646 $\pm$ 0.0096	0.3996 $\pm$ 0.0307	2.42
98	39	raiz	Flavoproteína wrbA	0.1348 $\pm$ 0.0148		n.a.
99	66	raiz	Proteína de reserva vegetativa - VSP β (Precursor da Glicoproteína de 31 KDa do caule)	0.2622 $\pm$ 0.0314	0.0725 $\pm$ 0.0037	-3.66
100	12	raiz	LOC100305867	0.6191 $\pm$ 0.0699	1.3236 $\pm$ 0.1972	2.14
101	16	raiz	LOC100305867	0.3035 $\pm$ 0.0440	0.6480 $\pm$ 0.1248	2.13
103	34	raiz	HSP 18.5 kDa	0.1178 $\pm$ 0.0089	0.2503 $\pm$ 0.0333	2.12
105	51	raiz	Glutathione S-transferase	0.0591 $\pm$ 0.0061	0.0843 $\pm$ 0.0045	1.42
107	72	raiz	Anidrase carbonica γ	0.0411 $\pm$ 0.0030	0.0632 $\pm$ 0.0023	1.53
108	92	raiz	Quinona oxidoreductase	0.1568 $\pm$ 0.0303	0.2979 $\pm$ 0.0321	1.89
110	145	raiz	Peroxidase 54kDa (classe III)	0.1646 $\pm$ 0.0096	0.3996 $\pm$ 0.0307	2.42
112	274	raiz	HSP 18.2 kDa		0.1518 $\pm$ 0.0243	n.a.
113	276	raiz	Hidromirystoil - ACP desidratase		0.3147 $\pm$ 0.0214	n.a.
117	447	raiz	ATP sintase - cadeia delta		0.0891 $\pm$ 0.0000	n.a.
119	450	raiz	LOC100500621		0.0658 $\pm$ 0.0051	n.a.
120	458	raiz	Ferritina 4		0.1371 $\pm$ 0.0160	n.a.
125	471	raiz	Proteína 14-3-3 A		0.0621 $\pm$ 0.0012	n.a.
126	475	raiz	Proteína 14-3-3		0.2277 $\pm$ 0.0084	n.a.
127	478	raiz	Proteína 14-3-3 C		0.0495 $\pm$ 0.0042	n.a.
128	477	raiz	Fator de elongação 1 β (EF1B β)		0.0504 $\pm$ 0.0027	n.a.
130	482	raiz	Fator de elongação 1 β (EF1B β)		0.0678 $\pm$ 0.0093	n.a.
131	484	raiz	6'-Deoxychalcona sintase (dependente de NAD(P)H)		0.1584 $\pm$ 0.0082	n.a.
132	445	raiz	Inibidor subtilisin da α -amilase		0.1170 $\pm$ 0.0131	n.a.
135	519	raiz	Fumarilacetatoacetato hidrolase		0.1970 $\pm$ 0.0314	n.a.
137	539	raiz	ATP sintase - subunidade Beta		0.3000 $\pm$ 0.0454	n.a.

⁽¹⁾ Os números correspondem aos spots numerados na Figura 2 e 3. ⁽²⁾ Os números correspondem ao número de referencia elencado pelo programa de análise dos géis bidimensionais, software Image Master 2D platinum. ⁽³⁾ Os valores representam as médias da porcentagem em volume (abundância relativa) $\pm$ o desvio padrão de três replicatas biológicas. Condições irrigadas ($\Psi_{pd} \geq -0,05$ MPa) e condições não-irrigadas ($\Psi_{pd} = -1,5$ MPa). As barras azuis significam em números de vezes o quanto a abundância protéica aumentou ou diminuiu na condição não-irrigada em relação à condição tratada. Todos os valores de médias diferem entre si estatisticamente segundo Teste T de Student com nível de significância $p \leq 0,05$.

Lipoxigenases

Em relação à expressão da proteína Lipoxigenase foi observado uma redução na expressão de duas isoformas (spot 67; spot 69) em raízes quando as plantas foram submetidas as condições de déficit hídrico (Figura 4 e Tabela 3). As lipoxigenases (EC 1.13.11.12) agem na catalização da dioxigenação de ácidos graxos insaturados como o ácido linoleico, ácido linolênico e ácido araquidônico formando os hidroperóxidos de ácidos graxos (Liavonchanka; Feussner, 2006). Em plantas estes primeiros produtos são precursores de inúmeros oxilipins que possuem um importante papel no desenvolvimento da raiz lateral (Vellosillo *et al.*, 2007), e na defesa contra estresses bióticos (Weber, 2002; Chehab *et al.*, 2008).

A biossíntese de ácido jasmônico é iniciada pela conversão do ácido linolênico em membranas lipídicas no fitohormônio, que está associado a muitas formas de estresses abióticos e apresenta-se aumentado depois de estresses hídricos (Creelman; Mullet, 1995; Ozturk *et al.*, 2002; Wendelboe-Nelson; Morris, 2012). Aumentos significativos na atividade de lipoxigenases também foram observados durante o estresse hídrico progressivos em folhas e raízes (Sofa *et al.*, 2004). E ainda, os transcritos de lipoxigenases foram significativamente induzidos em condições de déficit hídrico em genótipos de milho (Li *et al.*, 2012). Apesar do evidente aumento de ácido jasmônico em resposta aos estresses abióticos em várias espécies de plantas, o papel dos jasmonatos nessas respostas é ainda pouco conhecido (Mahouachi *et al.*, 2007; Arbona; Gomez-Cadenas, 2008; Brossa *et al.*, 2011).

Flavoproteína wrbA

Uma redução na expressão desta proteína (spot 78) em raízes nas condições de déficit hídrico (Figura 4 e Tabela 3) foi observada. As flavoproteínas wrbAs são distribuídas na família das flavodoxinas e tem papel na defesa contra estresses oxidativos, consistente com sua atividade de NAD(P)H: quinona oxidoreductase (NQO) (Grandori; Carey, 1994; Patridge; Ferry, 2006). Enzimas com função de NQO atuam na manutenção de quinonas no estado reduzido de maneira a proteger as células de danos causados por espécies reativas de oxigênio (Jaiswal, 2000; Talalay; Dinkova-Kostova, 2004). O papel antioxidante de wrbA foi confirmado pelos resultados que mostraram que a expressão desta proteínas é controlado

pelas respostas ao estresse (Lacour; Landini, 2004). Esta hipótese é evidenciada pela abundância e atividade de membros de proteínas das famílias das flavodoxinas que exibem alteração na expressão durante respostas a estresses (Cheng *et al.*, 2008; Meisrimler *et al.*, 2011).

Chalcona isomerase

A redução na expressão de duas proteínas Chalcone isomerases (spot 79; spot 84) foi observado neste trabalho sob condições de déficit hídrico (Figura 4 e Tabela 3). Os flavonóides são sintetizados pela via dos fenilpropanóides onde o aminoácido fenilalanina é usado para produzir o composto 4-coumaril-CoA, que combinado com malonil-CoA para dar origem às chalconas, que originam os flavonóides (Jez *et al.*, 2000). A enzima Chalcona isomerase é a enzima que catalisa a reação que tem como substrato uma chalcona, e produto uma flavona, durante a biossíntese de flavonóides.

Em raízes, sabe-se que esta enzima pode influenciar no processo de nodulação, e ainda sua expressão é significativamente reduzida por estresses abióticos como o déficit hídrico (Sengupta; Reddy, 2011). Os flavonóides são encontrados também com o papel de mediar a comunicação entre as bactérias do solo e as raízes das plantas, e então contribuindo para a formação de nódulos nas raízes (Stafford, 1997). Segunda a literatura, é bem estabelecido que as condições de seca afetem a fixação de nitrogênio e a atividade dos nódulos radiculares através de mecanismos complexos (Abdel-Waheb *et al.*, 2002; Marino *et al.*, 2007). Os meus resultados mostram que a redução da expressão desta enzima pode estar associado às alterações no metabolismo de nitrogênio.

Precursor da Glicoproteína de 31 KDa do caule (Proteína de reserva vegetativa – VSPβ)

A redução na expressão de duas proteínas VSPβ (spot 80 e 99) foi observado em raízes quando as plantas foram submetidas às condições de déficit hídrico (Figura 4 e Tabela 3). As SPs, proteínas de reserva, são classificadas em duas classes, proteínas de reserva de sementes (SSPs) e proteínas de reserva vegetativas (VSPs) (Wittenbach, 1982). As VSPs foram primeiramente descritas em folhas de soja, e são compostas por dois tipos, as ~~VSP~~ VSPβ (Wittenbach,

1983), e são consideradas como reserva de nitrogênio temporário. Esses dois genes VSPs são regulados pelo desenvolvimento e respondem as condições de déficit hídrico, à fermentos, à metil jasmonatos, açúcares e luz (Staswick, 1990; Berger *et al.*, 1995). Estas proteínas também são moduladas pelas mudanças na relação fonte-dreno, e alterações no particionamento de nitrogênio conduzidas pelo acúmulo de VSPs podem ser induzidas pela redução no crescimento da parte aérea, pela remoção de vagens, ou eliminação de botões florais em soja (Tranbarger *et al.*, 1991; Staswick, 1994; Stephenson *et al.*, 1998). Em soja foi relatado a presença de um gene idêntico a VSP que é expresso exclusivamente em nódulos das raízes, tendo relativamente uma baixa abundância, e exibindo uma alta atividade de fosfatase ácida (Penheiter *et al.*, 1997).

Isoflavona redutase

Duas isoformas (spot 82,92) da enzima isoflavona redutase (IFR) foram detectados em raízes somente em plantas que receberam plena irrigação (Figura 4 e Tabela 3). As isoflavonas redutases são enzimas que catalisam reações de redução dependente de NADPH, e são específicas da via de biossíntese dos isoflavonóides.

Através de análises proteômicas foi demonstrado que genes idênticos a IFR (IRL) são induzidos 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). Entretanto, em um outro trabalho com raízes de soja, submetidas também as condições de déficit hídrico ocorreu a redução na expressão de duas isoflavonas reductases (Alam *et al.*, 2010).

Análises fisiológicas documentaram um aumento no acúmulo de flavonóides sob condições de déficit hídrico, e o potencial destes compostos contra danos oxidativos (Hernández *et al.* 2009). Entretanto, com a severidade do estresse, ocorrendo a redução na produção de carboidratos devido a queda na taxa fotossintética, estes carboidratos não estariam mais sendo direcionados para a produção de metabólitos secundários, portanto, enzimas associadas a produção de flavonóides seriam alvos de uma regulação negativa, gerando a redução na sua expressão.

Fosfoglicerato mutase (independente de 2,3-bifosfoglicerato)

A Fosfoglicerato mutase (spot 90) mostrou uma redução na expressão em raízes das plantas submetidas as condições de déficit hídrico (Figura 4 e Tabela 3). Esta enzima glicolítica catalisa a interconversão do grupo fosfato entre o carbono C-3 do 3-fosfoglicerato (3-PGA) e do carbono C-2 do 2-fosfoglicerato (2-PGA), sendo distribuídas em dois grupos baseado em como estas enzimas requerem o 2,3-bifosfoglicerato como cofator, as dependentes (EC 5.4.2.11) e as independentes (EC 5.4.2.12). Estudos bioquímicos sugerem uma mudança no particionamento de carbono sob condições de déficit hídrico como umas das respostas adaptativas.

Kosola e colaboradores (1994) mostraram que a alocação de carbono na superfície de raízes finas reduziu em 80% quando as raízes foram submetidas ao déficit hídrico (Kosola; Eissenstat, 1994). Em plantas de soja submetidas ao déficit hídrico o proteoma das raízes mostrou uma redução na expressão de uma Fosfoglicerato mutase independente de 2,3-bifosfoglicerato, assim como em nossos resultados (Alam *et al.*, 2010). A diminuição de enzimas glicolíticas em resposta ao estresse hídrico pode ser uma consequência da redução do crescimento assim como um mecanismo para acumular açúcares como fonte de energia para a recuperação rápida quando a água estiver disponível.

Alcool desidrogenase

A redução de uma Álcool desidrogenase (spot 91) foi observada em raízes submetidas as condições de déficit hídrico (Figura 4 e Tabela 3). Esta enzima (ADH; EC 1.1.1.1) participa na interconversão entre alcoóis e aldeídos ou cetonas com a redução de uma nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD).

O aumento da expressão de ADH foi demonstrado em resposta à seca, estresse térmico, e ácido abscísico em alguns trabalhos (Irigoyen *et al.*, 1992; Sridhar *et al.*, 2000; Hwang; Van Toai, 1991). Liu e colaboradores (2013) mostraram em milho, que a expressão de ADH1 foi significativamente aumentada com a combinação de dois estresses, estresse hídrico e térmico, e ainda que o ABA promoveu o aumento de ADH1, evidenciando um papel importante desta proteína em resposta a estresse ambientais (LIU, ZHANG, *et al.*, 2013). Newman e Van toai (1992) descreveram três genes Adh em plantas de soja. Um destes é expresso em todos órgãos da plantas e induzido por anaerobiose, o segundo é expresso somente

em órgãos anaeróbicos, e o terceiro em somente em raízes anaeróbicas, e é responsável pela interconversão do acetoaldeído e etanol reciclando o NADH em NAD (Newman; Van Toai, 1992). Em contradição ao encontrado na literatura, nossos resultados apresentaram uma redução na expressão desta proteína.

3R-hydroxymiristoil-ACP desidratase

A enzima 3R-hydroxymiristoil-ACP desidratase (spot 113) foi encontrada somente quando as plantas foram submetidas às condições de déficit hídrico (Figura 4 e Tabela 3). Os ácidos graxos são sintetizados por séries cíclicas de reações que ocorrem em substratos acyl ligados a proteína ACP (*acyl carrier protein*). Na terceira etapa de elongação, o 3-hidroxiacyl-ACP é convertido em trans-2-enoyl-ACP por uma reação de desidratação catalisada pela enzima 3R-hydroxymiristoil-ACP desidratase, também chamada de β -hidroxiacyl ACP desidratase (Upchurch, 2008).

A modificação na fluidez de membrana é mediada por mudanças nos níveis de ácidos graxos insaturados, uma função feita em parte pela regulação da atividade das desaturases, induzindo resistência a estresses (Iba, 2002). Alguns ácidos graxos são precursores de oxilipinas que estão envolvidas na defesa contra patógenos em raízes (Blee, 2002). Segundo Zhou e colaboradores (2009), em estudos do proteoma diferencial induzido por estresse por alumínio em raízes de tomate, evidenciou uma redução na expressão da 3R-hydroxymiristoil-ACP desidratase (Zhou et al., 2009). A alteração na expressão desta proteína pode estar associado a ajustamentos na fluidez de membrana, que são afetados durante as condições de estresse.

Ferritina

A proteína Ferritina (spot 120) mostrou um aumento na expressão em raízes em condições de déficit hídrico (Figura 4 e Tabela 3). Durante o desenvolvimento da planta, o ferro é absorvido pelas raízes e então distribuído para os órgãos da planta. Neste contexto, as ferritinas são uma família de proteínas de armazenamento de ferro (Arosio et al., 2009), e desempenha um papel importante no estresse oxidativo primário pela remoção do ferro livre (Becana et al., 1998; Briat et al., 2010). Assim, a ferritina funcionaria com um eliminador de espécies

reativas de oxigênio onde a oxidação do Fe (II) para Fe (III) consome oxigênio e peróxido de hidrogênio antes do ferro ser estocado na ferritina (Arosio et al., 2009).

As ferritinas destacam-se por ser uma família de proteínas uniformemente reguladas em condições de déficit hídrico, tendo sua expressão fortemente aumentada nestas condições (Kang; Udvardi, 2012). Clement e colaboradores (2008) também mostraram que a expressão de ferritina foi induzida em nódulos de raízes de soja em resposta à seca (Clement *et al.*, 2008), estando em acordo com os nossos resultados encontrados em raízes de soja. As condições de déficit hídrico causam o impedimento da fotossíntese e uma deficiência em clorofilas que ocasiona uma inanição por ferro podendo desencadear uma clorose foliar. Nestas condições, o sistema de absorção de ferro pelas raízes pode ser induzido com a função de aumentar a aquisição de ferro e para manter a integridade fisiológica (Briat, 2008).

Proteína 14-3-3

A expressão de três isoformas (spot 125; 126; 127) da proteína 14-3-3 somente foi detectada em raízes nas condições irrigadas (Figuras 4 e Tabela 3). Inúmeras proteínas interagem com a proteína 14-3-3, sugerindo que esta proteína pode potencialmente estar envolvida em muitas rotas de sinalização e em muitos processos fisiológicos em plantas (Chang *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2009). Vários trabalhos relatam o aumento na expressão de algumas isoformas das proteínas 14-3-3 em estresses abióticos e bióticos (Schoonheim *et al.*, 2007; Konagaya *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006).

A interação de proteínas 14-3-3 com vias de sinalização de hormônios em plantas foi demonstrada em estresse hídrico através da via de sinalização mediada pelo ABA, onde ocorre o aumento da expressão de genes responsáveis pela tolerância a estresses devido a interação de proteínas 14-3-3 com fatores transcricionais destes genes (Chandler; Robertson, 1994). Outro trabalho com raízes de cevada, mostrou um aumento na expressão de isoformas de proteínas 14-3-3 em resposta ao tratamento com ABA (Schoonheim *et al.*, 2007).

Alguns trabalhos mostraram o envolvimento da proteínas 14-3-3 no metabolismo de carbono e nitrogênio como as enzimas sacarose fosfato sintase,

nitrato redutase e glutamina sintetase (Comparot et al., 2003). Em adição, a redução na expressão de proteína 14-3-3 esta relacionada com o aumento nos níveis de amido, nitrato e sacarose (Zuk et al., 2005).

Existem outros trabalhos que destacam a função desta proteína na regulação da localização intracelular do fator transcricional GmMYB176 em soja, afetando a síntese de isoflavonóides e processos de nodulação na raízes nesta planta (Chen; Dhaubhadel, 2012; Radwan *et al.*, 2012).

Estas proteínas estão envolvidas em resposta a estresses abióticos e bióticos, metabolismo de carboidratos, metabolismo de nitrogênio, e ainda em vários aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas. Portanto, o aumento na expressão de três isoformas de proteínas 14-3-3 em nosso trabalho pode estar relacionado com as funções propostas e discutidas acima.

Fator de alongação

A expressão de duas isoformas de fatores de alongação (spot 128, 130) foi detectada em raízes somente em condições de déficit hídrico (Figura 4 e Tabela 3). Os fatores de alongação (eEFs) são proteínas importantes durante a fase de alongação no processo de tradução durante a síntese protéica.

Segunda classificação de Ejiri e colaboradores (1983), em plantas o eEF1B é um trímero composto por eEF1 α , eEF1 β e eEF1 β' (Ejiri *et al.*, 1983). Uma nova proposta de agrupamento foi sugerida onde o eEF1 δ (spot 130) juntamente com o eEF1 β estariam agrupados em um só grupo, o eEF1 β (Sourd *et al.*, 2006). Estas proteínas foram encontradas somente nas condições de déficit hídrico sugerindo seu aumento sob estas condições. Alguns trabalhos mostraram que várias proteínas associadas com a síntese de proteínas aumentam em condições de déficit hídrico, incluindo os fatores de alongação da tradução, sendo também reportado este aumento em condições de estresse osmótico, contribuindo para uma maior resistência ao estresse (Ndimba *et al.*, 2005; Yoshimura *et al.*, 2008). Em outro estudo com plantas de milho foi demonstrado um aumento na quantidade do fator de alongação em condições de estresse térmico (Moriarty *et al.*, 2002). Durante os estresses ocorre uma maior degradação protéica, em vista deste acontecimento, a célula é regulada para aumentar a tradução de proteínas para a manutenção da

integridade dos processos fisiológicos, podendo desencadear o aumento na expressão de proteínas envolvidas nestas etapas da tradução.

6'-deoxychalcona sintase (dependente de NAD(P)H)

A proteína 6'-deoxychalcona sintase dependente de NAD(P)H (spot 131) foi detectada em raízes somente nas condições de déficit hídrico (Figura 4 e Tabela 3). Esta enzima (EC 2.3.1.170) tem sua função exercida juntamente com a chalcona sintase na formação do composto 4,2',4'-trihidroxychalcona, que está envolvido na biossíntese de fitoalexinas (Stafford, 1991). Os compostos que têm atividade de fitoalexina estão envolvidos na defesa contra patógenos e pertencem a uma grande variedade de classes, sendo um deles o metabolito secundário flavonóide. O aumento na expressão de uma deoxychalcona sintase foi reportada em raízes de *M. truncatula* durante a associação micorrizica, supostamente mediando uma resposta protetora e desencadeando uma resposta de defesa (Schenkluhna *et al.*, 2010). Em estudos com *Cicer arietinum* a partir de bancos de ESTs a proteína deoxychalcona sintase foi indicada como um marcador de estresse hídrico (Varshney *et al.*, 2009). Foi reportado também o aumento da expressão desta proteína em cultivares de soja submetidas a estresse por alumínio, ressaltando o papel importante na tolerância a este tipo de estresse (Zhen *et al.*, 2007).

Fumarylacetoacetase

A proteína Fumarylacetoacetase (spot 135) foi encontrada somente nas condições de déficit hídrico (Figura 4 e Tabela 3). Uma enzima importante no catabolismo da tirosina, produzindo o metabolito fumarato do ciclo de krebs, também chamada de fumarylacetato hidrolase. Foi demonstrado em sementes de arabisopsis que sua expressão é aumentada durante a fase de dissecação da semente na germinação (Fait *et al.*, 2006). Em outro trabalho com Arabidopsis, foi demonstrado que a fumarylacetato hidrolase interage diretamente com proteínas kinases, sendo que o mutante para o gene da proteína kinase (AtMKK1) aumenta a tolerância ao estresse salino (Conroy *et al.*, 2013). Soares (2008), utilizando eletroforese bidimensional, mostrou mapas de proteínas diferencialmente expressas em raízes de *Coffea canephora* sob condições de déficit hídrico, onde foi verificado o aumento na expressão de enzimas glicolíticas e do Ciclo de Krebs,

evidenciando o papel da respiração como mecanismo de drenagem de excesso de poder redutor associado com a redução da fotossíntese líquida sob condições de estresse.

O modo cíclico do ciclo de Krebs fornece energia transferida a partir de cadeias carbônicas de substratos da respiração para formar ATP. Porém, estudos de modelos de fluxos no ciclo de Krebs mostram que o modelo cíclico nem sempre é utilizado, dando destaque aos fluxos não-ciclísticos em várias situações (Sweetlove et al., 2010). O aumento desta enzima está relacionado ao aumento do intermediário fumarato, que teria sua formação reduzida a partir do 2-oxoglutarato, uma vez que pode estar ocorrendo um ciclo não-ciclístico onde o metabolismo do ácido carboxílico estaria deslocado principalmente para fornecer esqueletos de carbono para a assimilação de nitrogênio a partir do acetyl-CoA até 2-oxoglutarato. Proposta esta que teria uma ligação com o aumento no conteúdo de proteínas nas sementes, uma vez que as raízes estariam deslocando reações não-ciclísticas para a assimilação de nitrogênio.

Inibidor subtilisin da α -amilase

O inibidor subtilisin da α -amilase (spot 132) foi detectado em raízes somente nas condições de déficit hídrico (Figura 4 e Tabela 3). Os inibidores proteicos de enzimas ativas do metabolismo de carboidratos ocorrem naturalmente em plantas, e estão envolvidos em várias funções no metabolismo, e entre elas a defesa. As α -amilases (EC 3.2.1.1) são enzimas monoméricas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas em moléculas de amido e outros polissacarídeos e oligossacarídeos relacionados, liberando malto-oligossacarídeos e glicose na forma α -anomérica. Gonzalez e colaboradores (1995) mostraram que a exposição de raízes de soja às condições de déficit hídrico resultava no aumento do conteúdo de sacarose nos nódulos, porém o conteúdo de amido diminuía significativamente (González et al., 1995). Mesquita (2013) trabalhando com a resposta diferencial de genótipos de soja frente às condições de déficit hídrico não observou alterações no conteúdo de amido em raízes sob diferentes níveis de estresse. Esta proteína inibidora da enzima α -amilase detectada somente em condições de déficit hídrico em meu trabalho reflete uma redução da atividade da enzima α -amilase e, logo, uma manutenção na quantidade de amido, corroborando com os resultados acima.

Tabela 4. Identificação por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF-TOF (AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 System) das proteínas diferencialmente expressas em folhas e raízes do genótipo Suprema submetida as condições de déficit hídrico no período reprodutivo (R4-R5).

Spot	Órgão	Proteína identificada ^(a)	GI ^(b)	Id glyma	Espécie	PMW		Cobertura ^(e) (%)	Peptídeos identificados
						teórico ^(c)	experimental ^(d)		
1	folha	HSP 70 KDa- cloroplastídica	356559803		<i>Glycine max</i>	5.2/73755	4.65/88423	3.77%	DLDEVILVGGSTR QFAAEISAQVLR
2	folha	ATP sintase cloroplastídica - subunidade alfa	356544122		<i>Glycine max</i>	5.2/55738	5.04/65053	7.25%	EAYPGDVLYLHRS HTLIYDDLSK IAQIPVSEAYLGR
3	folha	ATP sintase cloroplastídica - subunidade alfa	356544122		<i>Glycine max</i>	5.2/55738	5.12/64352	15.30%	ASSVAQVNTLQER EAYPGDVLYLHRS HTLIYDDLSK IAQIPVSEAYLGR IVNTGTVLQVGDGIAR TFTGEAEVLLK
4	folha	ATP sintase - subunidade beta CF1	83595727		<i>Glycine max</i>	5.3/533755	5.45/62631	29.70%	AHGGVSVFVGGER DTVGGQINVTCEVQQLGNR FVQAGSEVALLGR GMEVIDTGAALSPVGGATLGR IFNLGEPIDNLGPVDTR IGLGGAGVGK LAIFETGIK SAPAFIQDITK VALVYGMNEPPGAR VGLTALMAEYFR
5	folha	Transcetolase cloroplastídica	356576867		<i>Glycine max</i>	6.0/80079	5.97/94383	6.62%	AITGELPAGWEK FEALGWHVWVK LTQLPGTSIEGVEK NGNTGYDEIR
6	folha	Ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase-oxigenase ativase - cloroplastídica	356569334		<i>Glycine max</i>	6.0/47436	5.16/46487	9.98%	GLAYDISDDQDITR LVDTFPGQIDFFGALR VPLILGIWGGK
7	folha	Glutamina sintetase 2	356555606		<i>Glycine max</i>	6.7/47692	5.53/48635	25.20%	AAEIFSNIK AILNLSLR DHISAYGEGNER GGNNILVICDSYTPQGEPIPTNKR HETASINTFSWGVANR HKDHISAYGEGNER IAEYIWIGGTGIDVR VQAEVPWYGIEQEYTLQTNVK
8	folha	Fosfoglicerato cinase cloroplastídica	356557028		<i>Glycine max</i>	7.8/50067	5.61/45408	33.30%	ADLNVLDDNQITDTR AQGLSVGSSLVEEDKLDLATSLLAK ELDYLVGAVSSPK GVSLLLPSDVVIADK LASLADLFVNDAFGTAGR LVASLPDGGVLLLENVR RPFAAINGGSK VVPASAIPOGWMGLDIGPDSVK YLKPSVAGFLLQK YSLAPLVPR
9	folha	Fosfoglicerato cinase cloroplastídica	356557028		<i>Glycine max</i>	7.8/50067	5.61/45408	39.10%	ADLNVLDDNQITDTR AQGLSVGSSLVEEDKLDLATSLLAK ELDYLVGAVSSPK GVSLLLPSDVVIADK GVTTIIGGDSVAAVEK LASLADLFVNDAFGTAGR LSELIGIQVVK LVASLPDGGVLLLENVR RPFAAINGGSK VVPASAIPOGWMGLDIGPDSVK YLKPSVAGFLLQK YSLAPLVPR

Spot	Órgão	Proteína identificada ^(a)	GI ^(b)	Espécie	PI/MW		Cobertura ^(E) (%)	Peptídeos identificados
					teórico ^(c)	experimental ^(d)		
10	folha	Glutamina sintetase 2	351723245	<i>Glycine max</i>	6.7/47693	5.82/49165	3.70%	IIAEYIWGGTGIDVR
11	folha	Gliceraldeído-3-Fosfato desidrogenase A, cloroplastídica	356561064	<i>Glycine max</i>	7.6/43203	6.64/48899	28.80%	DLGIDLVEGTGVFVDR DSPLDVIAINDTGGVK ESADNELQQILSVCDPLVSDFR KTFAEEVNAAFR NPANLPWK TFAEEVNAAFR VIAWYDNEWGYSQR YDSILGTDFADVKPVGSDIISVDGK
13	folha	NADPH:Quinona oxidoreductase, cloroplastídica	363808268	<i>Glycine max</i>	6.7/34510	6.44/40099	31.00%	AWTYSEYVK FDVYVDTVGQTEQAFK LNPFYFESGK NLGADWPIDYTK SILVLGGAGGVGTHVQLAK SPFPFSQTVEAFHLETNR VIGSLAEYTAEEER
14	folha	unknown	255637547	<i>Glycine max</i>	5.6/33928	5.75/39497	11.00%	GLGVNLVLGDLYDHQSLVSAIK ILFIGGTGYIGK
15	folha	Ferredoxina-NADP redutase 1 - cloroplastídica	356559282	<i>Glycine max</i>	8.0/40571	5.71/37355	12.40%	DGIDWTEYKR DPNATIMLTGTGTGIAPFR LYSIASSAGDFGDSK
16	folha	Fibrilina (plastid-lipid-associated protein, cloroplastídica)	356555702	<i>Glycine max</i>	5.7/33295	4.46/33986	10.80%	GDGGSFVLK IPISNSNAQSWLLTTYLDEELR
17	folha	Fibrilina (plastid-lipid-associated protein, cloroplastídica)	356555702	<i>Glycine max</i>	5.7/33295	4.69/33508	3.59%	ALVDSFYGTDR
19	folha	Oxygen-evolving enhancer protein 2 - cloroplastídica	356567470	<i>Glycine max</i>	7.7/28435	5.39/27511	12.80%	EVEYPGQVLR QYSLTVLTR TNTDFLSYNGNGFK
23	folha	L-ascorbato peroxidase 2	351726325	<i>Glycine max</i>	5.6/27126	5.99/31038	5.60%	LAWHSAGTYDVSSK
24	folha	Anidrase Carbonica 1 - cloroplastídica	356571334	<i>Glycine max</i>	6.6/35445	6.29/30142	15.50%	EAVNVSLGNLLTYPFVR VCPSHVLDFOGGEAFVVR YAGTGAAYEYAVLHLK
25	folha	Proteína Lhc3 (sistema de coleta de Luz do Fotossistema)	356554088	<i>Glycine max</i>	8.6/29809	6.35/28252	18.10%	AGLIPOETALPWFR QYFLGLEK WLAYGEINGR YAMLGAVGAIAPILGK
28	folha	Metaloendoproteínase	351724817	<i>Glycine max</i>	6.3/34045	6.40/23017	5.57%	WQAGTTQLTYAFSPEPR
29	folha	Dehidrina /LEA-2 (Late embryogenesis abundant)	359807014	<i>Glycine max</i>	4.7/34364	4.45/38140	7.37%	IPLTLIFDDR VDLVDVPVFGR
30	folha	Dehidrina /LEA-2 (Late embryogenesis abundant)	359807014	<i>Glycine max</i>	4.7/34364	4.52/38123	8.97%	FSFEETVAILHLK NTYDDIKPGSIIPYR
31	folha	2-Cys peroxidoreoxin (BAS1) - cloroplastídica	356500615	<i>Glycine max</i>	6.0/28512	4.53/25185	9.40%	SYGVLPDQGIALLR
33	folha	sHSP 18.5 kDa	351721881	<i>Glycine max</i>	5.8/18503	5.68/19708	20.50%	DFFPFPNTLSSASFPEFSR VQIEDDKVLQISGER
67	raiz	Lipoxigenase 9S	351726848	<i>Glycine max</i>	5.9/96810	6.05/97000	4.40%	HASDEIYLGER SGWMTDEEFAR TDGENVLQFPPIHVAK
69	raiz	Lipoxigenase 9S	351726848	<i>Glycine max</i>	5.9/96810	6.20/97000	13.40%	EVIAGVNPWIR HASDEIYLGER LEDIPNHGTIEFVCSWVYNFR LFILDYQDAFIPYLTR SGWMTDEEFAR TDGENVLQFPPIHVAK TDPNSEKPGEVYVPR TGPVQLPYTLLHR DFFPFPNTLSAENSAFVSTR
75	raiz	uncharacterized protein LOC100527855 HSP small	351721734	<i>Glycine max</i>	5.5/17437	5.41/17936	12.40%	DFFPFPNTLSAENSAFVSTR
76	raiz	sHSP 18.5 kDa	351721881	<i>Glycine max</i>	5.8/18503	5.80/19818	11.20%	DFFPFPNTLSSASFPEFSR
78	raiz	Flavoproteína wrbA	356549433	<i>Glycine max</i>	6.0/21689	6.41/24751	21.80%	LWQVPETLSEEVLVK QPSDLELAQAFHQGK VYIVYVSTYGHIEK

Spot	Orgão	Proteína identificada ^(d)	GI ^(a)	Espécie	P/MW		Cobertura ^(e) (%)	Peptídeos identificados
					teórico ^(c)	experimental ^(b)		
79	raiz	Chalcona isomerase	14582263	<i>Glycine max</i>	6.2/23265	6.51/26662	56.40%	AVSAAVLETMIGEHAIVSPDLK DIISGPFKEK FTGIGVYLEDK ILPLAGAEYSK NVNFAPGASVYFR QSPDGILGLSFSEDAIPEK SVGTYGDAEAAAEK TSEELVHTLHFYR TYFLGGAGER
80	raiz	Proteína de reserva vegetativa - VSPβ (Precursor da Glicoproteína de 31 KI 359806656		<i>Glycine max</i>	6.7/29281	6.45/29265	14.60%	IVGIIGDQWSLLGDHR TIPEECVEPTKDYINGEQFR
82	raiz	Isoflavona redutase	356538212	<i>Glycine max</i>	5.5/35572	5.48/41506	13.50%	ETSPFNMYLLALYHSQQIK FFPSEFGLDVDR ILVLGPTGAIGR
84	raiz	Chalcona flavonona isomerase 1B-1	351723101	<i>Glycine max</i>	5.3/25028	5.34/27745	27.00%	FTGIGVYLEDK GLNIQEEFVK NAFKDQNFPPGSTVFYK SAAELDSLDFYR SYFLGGAGVR
86	raiz	HSP 70 kDa - cloroplastidica	356559803	<i>Glycine max</i>	5.2/73755	4.37/18355	1.89%	DLDEVILVGGSTR
87	raiz	HSP 70 kDa - cloroplastidica	356559803	<i>Glycine max</i>	5.2/73755	4.88/85666	3.77%	DLDEVILVGGSTR QFAAEISAVLR
90	raiz	Fosfoglicerato mutase(independente da 2,3-bifosfoglicetato)	356568270	<i>Glycine max</i>	5.6/60838	5.73/76487	18.10%	ALEYENFDK ALEYENFDKFR FGHVTFFWNGNR GWDQAVLGEAPYK IQILTSHTLEPVIAIGGPGGLAPGVR LPSHYLVSPPEIDR TSGEYLVYNGIR YAGMLEYDGELK
91	raiz	Alcool desidrogenase	356552775	<i>Glycine max</i>	6.1/40833	6.25/47141	8.68%	FGVNEFVNPK FITHTVPFSEINK GTFYGNYPKPR
92	raiz	Isoflavona redutase	356538212	<i>Glycine max</i>	5.5/35572	5.9/40861	16.70%	AGNPFTILVR FFPSEFGLDVDR HIWVASLK NLAQIDITVPPR QVDVVICSFGR
94	raiz	Peroxidase 54kDa (classe III)	356555869	<i>Glycine max</i>	7.6/39092	6.47/61704	8.94%	FDSNYYSNLQLQNGLLR MSIEVLTSQSQGEIR LWQVPETLSEEVLVK
98	raiz	Flavoproteína wrbA	356549433	<i>Glycine max</i>	6.0/21689	6.13/24862	21.80%	QPSOLEAQAFHQGK VVIYYSTYGHIEK
99	raiz	Proteína de reserva vegetativa - VSPβ (Precursor da Glicoproteína de 31 KI 359806656		<i>Glycine max</i>	6.7/29281	6.22/29177	26.80%	DYINGEQFR IVGIIGDQWSLLGDHR LAVEAHNIR LPNPMYIE TIPEECVEPTKDYINGEQFR TVNQQAFFYASER
100	raiz	uncharacterized protein LOC100305867	351726932	<i>Glycine max</i>	4.7/16533	4.6/16762	42.40%	DDAPLSDAVR GAFAFDEENSTVAPATLYK IIGAQTIEVEGNGGPGTVK ITASEGDQTSFVLQK KITASEGDQTSFVLQK
101	raiz	uncharacterized protein LOC100305867	351726932	<i>Glycine max</i>	4.7/16533	4.47/17076		
103	raiz	sHSP 18.5 kDa	351721881	<i>Glycine max</i>	5.8/18503	5.8/19788	37.30%	DFPFPNTLSSASFPEFSR EDKNDTWHR ENSAFVSTR ETPEAHVFK VLQISGER VOIEDDKVLQISGER
105	raiz	Glutathione S-transferase	351720934	<i>Glycine max</i>	5.6/25726	5.71/27208	10.70%	NNPLPSDPYQR WSQEFVNHPVK
107	raiz	Anidrase carbonica γ	359807119	<i>Glycine max</i>	5.8/29608	6.58/30632	7.69%	AIVSYGNWIR GSSIWYGVVLR AWITYSEYVK
108	raiz	Quinona oxidoreductase	363808268	<i>Glycine max</i>	6.7/34510	6.49/38937	34.50%	FDVYVDTVGQTEQAFK FNQSVLPEVK LNPYFESGK NLGADWPIDYTK SILVLGGAGGVGTHVIQLAK SPFPFSQTVFAHLETNR VIGSLAEYTAEEER

Spot	Orgão	Proteína identificada ^(a)	GI ^(b)	Espécie	PI/MW		Cobertura ^(e) (%)	Peptídeos identificados
					teórico ^(c)	experimental ^(d)		
110	raiz	Peroxidase 54kDa (classe III)	356555869	<i>Glycine max</i>	7.6/39092	6.48/61212	8.94%	FDSNYYSNLQLQNGLLR MSIIEVLTVGSQGEIR
112	raiz	HSP 18.2 KDa	356496106	<i>Glycine max</i>	5.6/16373	5.46/19039	1.34%	RLCQIEDAK
113	raiz	3R-Hidromiristoil - ACP desidratase	356558645	<i>Glycine max</i>	9.4/24486	6.02/21221	3.59%	FPFLLVDR FPFLLVDR
117	raiz	ATP sintase - cadeia delta	351734514	<i>Glycine max</i>	5.2/19924	5.17/21645	29.80%	AFDEVNSQLQTK FSQEPIDWDYYR FVDVTVPQYKPK LSTMTADEYFEK
119	raiz	LOC100500621	351720849	<i>Glycine max</i>	5.1/20481	5.48/24452	7.53%	GDAIVEYDFVNH
120	raiz	Ferritina 4 - cloroplastica	351724189	<i>Glycine max</i>	5.6/27559	5.63/27820	35.60%	ALTGVIFEPFEEVK ALTGVIFEPFEEVKK ELDLVPTVPQASLAR ISEYVAQLR LLNLHVSATK LQSIMPLSDFDHADK NGDVQLADFVETYLGEQVEAIK
125	raiz	Proteína 14-3-3 A	351720808	<i>Glycine max</i>	4.7/29064	4.68/32110	37.00%	DNLTWLTSOITDAGDEIK DSTLIMQLLR ISSIEQK QAFDEAISELDLGEESYK SAQDIALADLAPTHPIR TVEVEELTVEER YEEMVEFMEK
126	raiz	Proteína 14-3-3	356552916	<i>Glycine max</i>	4.7/29283	4.67/33572	46.70%	AAQDIANTELPPTHPIR DNLTWLTSOMQDDGADK DSTLIMQLLR GNEDHVAIVR IEAELSNICDGLK ISSIEQK QAFDEAIAELDLGEESYK VSASAESEELTVEER YEEMVEFMEK
127	raiz	Proteína 14-3-3 C	351721599	<i>Glycine max</i>	4.8/29250	4.90/35101	15.10%	DSTLIMQLLR LNVELTVEER QAFDEAISELDLGEESYK
128	raiz	Fator de elongação 1β (EF1β)	351724085	<i>Glycine max</i>	4.6/24328	4.52/35101	25.90%	LVPVGYGK VYGAVLEKPGDSFPNAK VYVSGDQFTK WYEVVSSQLAASFPGNAQGV
130	raiz	Fator de elongação 1δ (EF1δ)	356516563	<i>Glycine max</i>	4.4/25032	4.39/36018	37.40%	AAVAEDDDDDVDLFGTEETEEK DDLTVYAALPTAPSEYGNVSR KLDEYLLPR LDEYLLPR LVPVGYGK SVQMEGLLWGASK SYITGYQATK
131	raiz	6'-Deoxychalcona sintase (dependente de NAD(P)H)	356568945	<i>Glycine max</i>	6.1/35137	6.59/36018	38.40%	DQLFITTK GITVAFSPLR GPTKPLDDLWDEE GWGSMEECOR LLSFATIPPAVNOVEVNLGWQQK LWVTDNHAHTLPALQK TAAQICLR VYPIEVSEIVEFDMK WLYEQGLTFVVK
132	raiz	Inibidor subtilisin da α-amilase	356556646	<i>Glycine max</i>	4.8/23537	4.55/20748	30.60%	DETTGSYGNVFR FICGTGGILR IVETENVGINIQWCPTVCPCR VAFDEVSTTCVQSTEW
135	raiz	Fumarilacetato hidrolase	356555724	<i>Glycine max</i>	5.8/45822	5.92/53723	2.85%	GPOTPLVDNWYR
137	raiz	ATP sintase mitocondrial - subunidade Beta	356575611	<i>Glycine max</i>	5.8/59847	5.27/61568	2.33%	VGLTGLTVAEHFR

(a) identificação putative através do MASCOT MS/MS Ion search;

(b) GenInfo Identifier (GI) – número de acesso no National Center for Biotechnology Information (NCBI)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

(c) ponto isoeletrico e massa teorica determinada no Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>)

(d) ponto isoeletrico e massa experimental determinada pelo Image master 2D Platinum ;

(e) porcentagem de cobertura obtida no software Scaffold (Proteome Software, Inc., Portugal, OR).

Análise da expressão gênica relativa em folhas e raízes por PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)

Para investigar mudanças na expressão gênica em nível de mRNA, foi realizado um PCR quantitativo em tempo real utilizando folhas e raízes submetidas as condições de déficit hídrico (Figura 5 e 6). Foram analisados quinze genes em folhas e oito genes em raízes do genótipo de soja Suprema, em que a abundância de transcritos medida pelo PCR quantitativo em tempo real foi similar na maioria dos casos à abundância relativa observada nas análises proteômicas para folhas e raízes (Tabela 3). Esta similaridade não foi observada em folhas para as 6 proteínas seguintes: quinona oxidoreductase, abscisic stress ripening, Aldo-ceto redutase, LEA-2, glutamina sintetase e anidrase carbônica (Figura 3 e 5). Em raízes, em apenas duas proteínas, peroxidase 54 e 3R-Hidromirystoil ACP desidratase, não foi observado tal similariedade (Figura 4 e 6).

Em folhas, todos genes analisados apresentaram uma redução na expressão em condições de déficit hídrico, com exceção do gene ASR1 que apresentou um aumento nestas condições (Figura 5). Em raízes, os genes isoflavona redutase, flavoproteína WrbA, peroxidase 54, hidromyristoil-ACP desidratase e fosfoglicerato mutase apresentaram uma redução sob condições de déficit hídrico. Os genes das proteínas Ferritina-4 e inibidor da α -amilase mostraram um aumento na expressão nestas mesmas condições (Figura 6).

Os meus resultados mostraram que já está ocorrendo uma repressão em nível transcricional de genes que participam das etapas da fotossíntese - reações nos fotossíntemas e ciclo de Calvin-Benson - como as proteínas rieske, LHC3, OEE2, FNR, NADPH quinona oxidoreductase, 3-GPD, TK, e anidrase carbônica, como relatado também por outros trabalhos (Chaves et al., 2008; Sun et al., 2006). A redução no transporte de elétrons também foi observado em análises fisiológicas (Tabela 2) e tem relação com a redução na expressão NADPH quinona oxidoreductase (Figura 5).

A função molecular atribuída a proteína ASR, que teve sua expressão aumentada em nível transcricional (Figura 5), tem sido a de regulador transcricional do transportador de glicose, participando de uma cross-talk entre a sinalização de açúcares e ABA (Cakir et al., 2003; Carrari et al., 2004). Os genes ASR estão envolvidos em respostas de plantas aos estresses ambientais, e tem, tipicamente, sua expressão aumentada em resposta ao ABA e estresses abióticos (Jeanneau et al., 2002; Cakir et al., 2003; Yang et al., 2005). O baixo peso molecular e a alta hidrofobicidade das proteínas ASRs tornam estas proteínas candidatas a função de proteção de outras proteínas, semelhante as proteínas LEA, além disso a localização nuclear preferencial e a interação direta com o DNA sugerem sua ação como reguladores transcricionais (Maskin et al., 2001; Wang et al., 2003; Carrari et al., 2004).

Duas isoformas de Glutamina sintetase, a GS1 localizada no citossol e a GS2, no cloroplasto (Edwards et al., 1990) são presentes em plantas, sendo que meus resultados observaram a redução na expressão de apenas uma isoforma (Figura 5). As análises proteômicas detectaram duas isoformas desta proteína, sendo que na primeira (spot 7) foi observado um aumento na porcentagem em volume, já na segunda foi observado uma redução (spot 10), ambas frente às condições de déficit hídrico (Figura 3 e Tabela 3). Ressalta-se portanto, que a redução na expressão deste transcrito pode ser relacionada com a redução na expressão da isoforma GS2 em análises proteômicas (Figura 3 e Figura 5), e com a regulação negativa do consumo de energia frente às condições de déficit hídrico.

Os resultados onde a expressão de um gene nas análises por PCR quantitativo em tempo real não segue o padrão observado na expressão deste mesmo gene em análises proteômicas podem ser explicados por algum tipo de regulação traducional ou pós-traducional, variações isoenzimáticas, eventos de splicing alternativo. Os resultados desta análise mostram que as mudanças em nível transcricional nem sempre correspondem as mudanças em nível de proteínas, como relatado por outros trabalhos (Gygi et al., 1999; Tian et al., 2004; Mackay et al., 2004; Piquet et al., 2009; Schwanhauser et al., 2011; Fernie; Stitt, 2012).

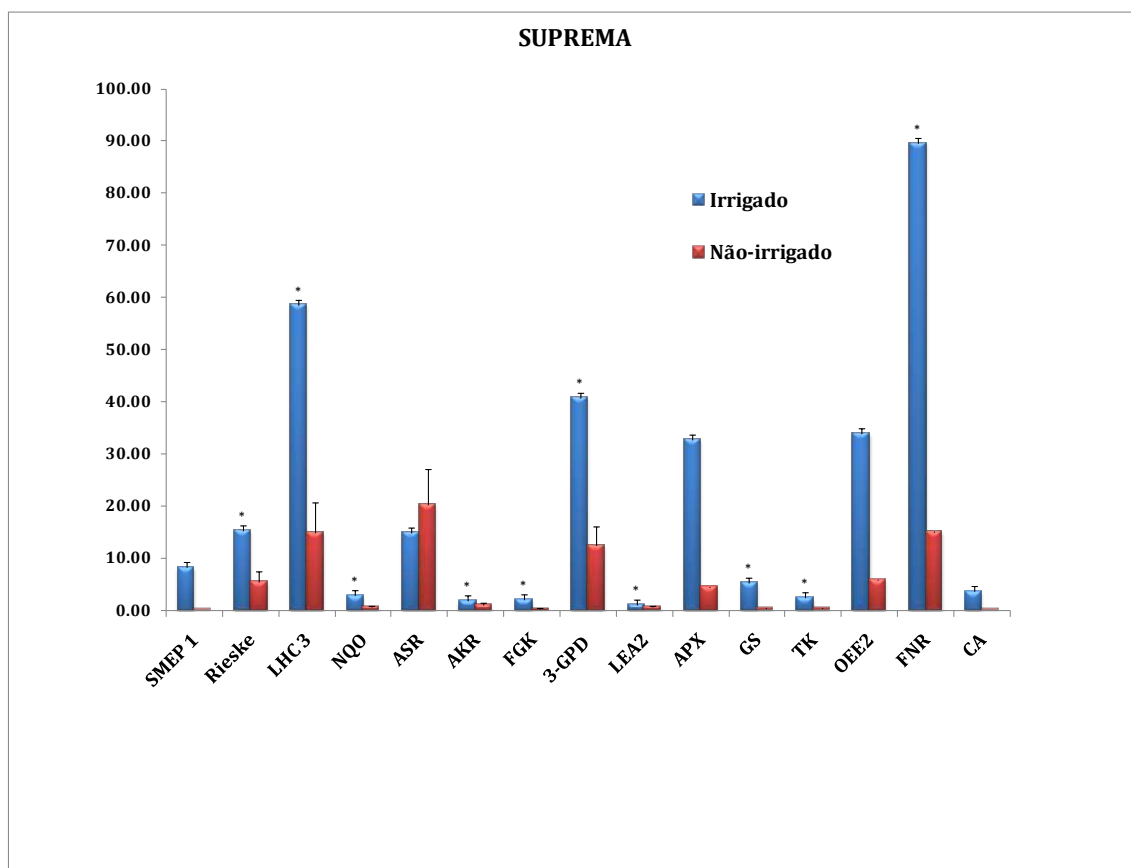


Figura 5. Análise da expressão gênica relativa por PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR) em folhas do genótipo Suprema submetidas às condições de déficit hídrico no estágio reprodutivo (R4-R5). *Estatisticamente significativas segundo t-test de Student's ($p < 0.05$). SMEP1 (metaloendoproteínase); Rieske (Complexo do Citocromo b6f); LHC3 (proteína do sistema de coleta de Luz do Fotossistema); NQO1 (Quinona oxidoreductase); ASR (abscisic stress ripening protein); AKR (Aldo-ceto redutase); FGK (Fosfoglicerato cinase); 3-GPD (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase); LEA2 (Deidrina); APX (Ascorbato peroxidase); GS (Glutamina sintetase); TK (Trancetolase); OEE2 (Complexo de evolução do oxigênio 2); FNR (Ferrodoxina NADP redutase); CA (Anidrase carbônica).

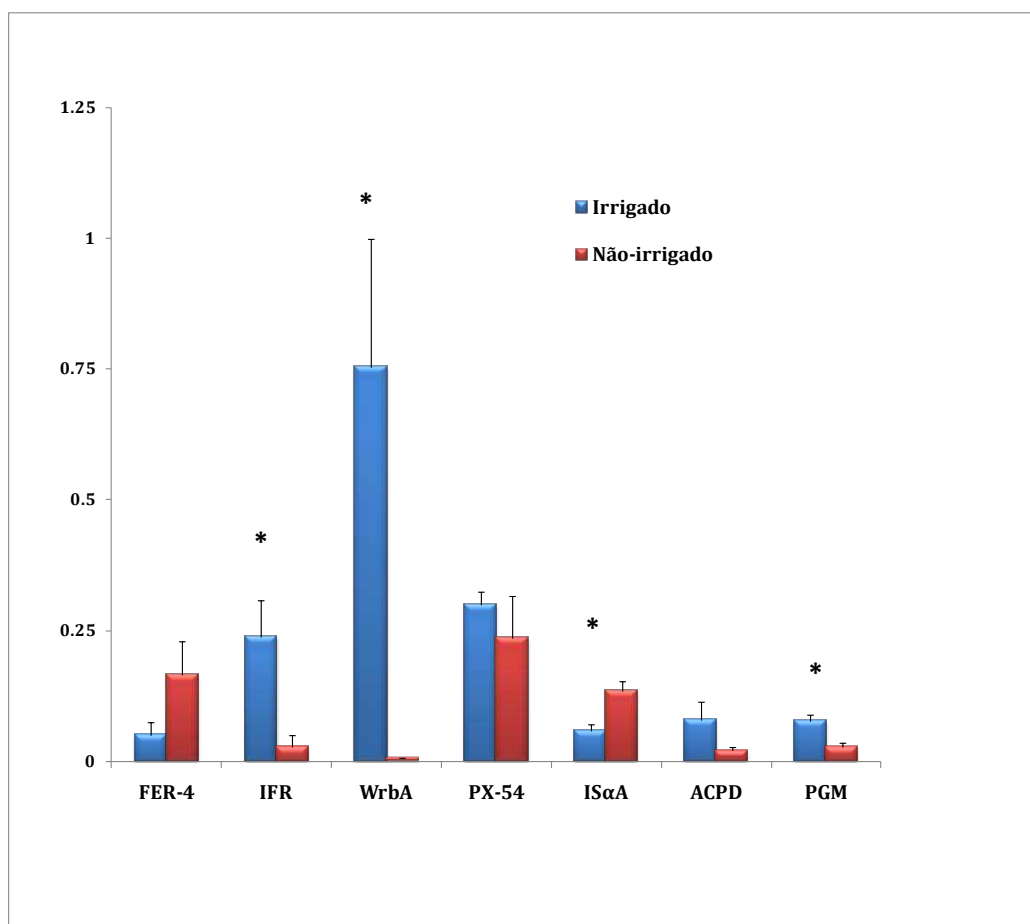


Figura 6. Análise da expressão gênica relativa por PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR) em raízes do genótipo Suprema submetidas às condições de déficit hídrico no estágio reprodutivo (R4-R5). *Estatisticamente significativas segundo t-test de Student's. ($p < 0.05$). FER-4 (Ferritina 4); IFR (Isoflavona redutase); WrbA (flavoproteína WrbA); PX-54 (peroxidase); ISαA (Inibidor Subtilisin da α -amilase); ACPD (3R-Hidromirystoil - ACP desidratase); PGM (Fosfoglicerato mutase independente da 2,3-bifosfoglicetato).

Análise do conteúdo de óleo e proteína por espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR)

O desenvolvimento da semente inicia com o estágio de embriogênese no qual o embrião maduro desenvolve a partir de uma célula fertilizada e por uma série de processos que é chamado de morfogênese. Após a morfogênese, o desenvolvimento das sementes entra na fase de maturação, que também é denominado o período de acumulação de reservas, e essencialmente inclui a reorganização do metabolismo de síntese e armazenamento de compostos como amido, proteína e óleo. Após o período de acúmulo de reservas as sementes entram no período final de maturação, onde a semente passa por um período de desidratação ou dessecação (Brown, 1985). Uma meta-análise realizada por Rotundo & Westgate (2009) mostrou que o estresse hídrico durante o enchimento do grão aumentava a concentração de proteína, e diminuía a concentração de óleo.

Através da análise do conteúdo de óleo e proteína por espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) verificamos uma redução no conteúdo de óleo e um aumento no conteúdo de proteína em sementes do genótipo suprema quando submetido às condições de déficit hídrico (Figura 7).

Rotundo & Westgate (2010) discutem sobre duas hipóteses complementares que podem explicar este fato. Uma possibilidade é que em condições de estresse hídrico a remobilização de nitrogênio das folhas e das paredes das vagens aumentaria a disponibilização de nitrogênio, aumentando a taxa de acumulação de proteínas nas sementes compensando as baixas taxas de acumulação de óleo. Nas análises proteômicas realizadas, os resultados mostram uma concordância com os resultados de conteúdo óleo e proteína nas sementes (Tabela 3). Nestas análises, pode-se verificar que proteínas relacionadas com o acúmulo, remobilização ou reassimilação de nitrogênio tiveram um aumento na expressão, como a proteína glutamina sintetase, proteína 14-3-3, Fumarylacetoacetase, determinando um menor impacto do estresse no conteúdo final de proteína nas sementes. Por outro lado, a redução de 1/3 nos valores de fotossíntese líquida em plantas não-irrigadas quando comparadas as plantas irrigadas (Tabela 2), e ainda a redução na expressão de proteínas relacionadas com a metabolismo de carbono verificadas em análises proteômicas e transcriptômicas (Tabela 3, Figuras 5 e 6) mostram que a imposição do déficit hídrico resulta nas

baixas taxas de óleo nas sementes, uma vez que este processo é altamente dependente daquele metabolismo.

Os meus resultados sugerem mudanças compensatórias na razão fonte-dreno uma vez que em análises fisiológicas, proteômicas e transcriptômicas de folhas e raízes observou-se alteração no metabolismo de carboidratos, na fotossíntese e no metabolismo de nitrogênio, e na expressão de proteínas envolvidas nesses processos após a aplicação do déficit hídrico.

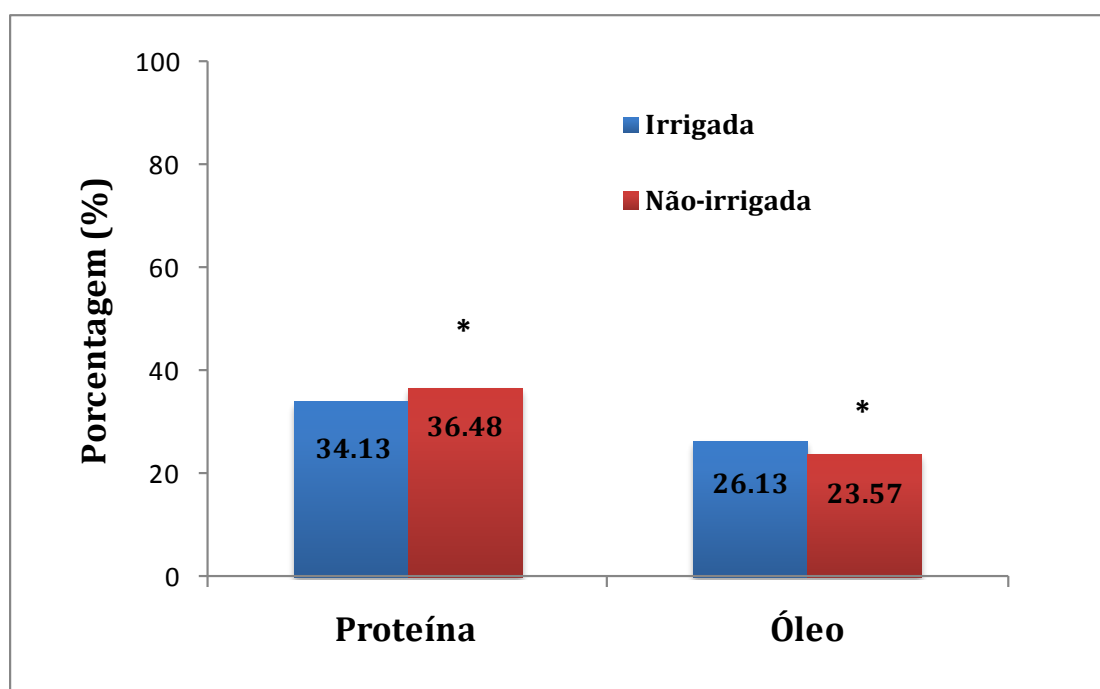


Figura 7. Análise do conteúdo de óleo e proteína por *espectroscopia de infravermelho próximo* com transformada de *Fourier* (FT-NIR) em sementes maduras (R8) do genótipo Suprema submetidas às condições de déficit hídrico. Estatisticamente significativas segundo t-test de Student's. ($p < 0.05$).

CONCLUSÕES

Neste trabalho, as condições de déficit hídrico aplicadas durante o estágio reprodutivo nas plantas de soja foi suficiente para que ocorressem alterações fisiológicas que determinaram mudanças no conteúdo de óleo e de proteínas nas sementes maduras do genótipo suprema.

Foi verificado, que além de limitações estomáticas, evidenciadas pela redução na condutância estomática, limitações bioquímicas que afetam a fixação de carbono também estariam ocorrendo e foram confirmadas a partir da redução na expressão de proteínas envolvidas nas reações nos fotossíntemas e ciclo de Calvin-Benson, como as do complexo do citocromo b6f, complexo coletor de luz 3 (LHC3), complexo de evolução do oxigênio 2 (OEE2), ATP sintase cloroplastídica, rubisco ativase, ferredoxina NADP redutase, NADPH quinona oxidoreductase, 3-gliceraldeído fosfato desidrogenase, transcetolase, anidrase carbônica, fosfoglicerato mutase, fosfoglicerato cinase. Sendo assim, a redução de várias enzimas envolvidas no metabolismo de carbono observadas em resposta ao déficit hídrico em folhas, podem ser relacionadas com a redução no conteúdo de óleo nas sementes, uma vez que este processo é altamente dependente daquele metabolismo.

Nas raízes, evidências da utilização de fluxos não-cíclicos, com aumento na expressão da proteína Fumarylacetoacetase, mostram um deslocamento de intermediários do metabolismo do ácido carboxílico para a assimilação de nitrogênio a partir do acetyl-CoA até 2-oxoglutarato. E ainda, com aumento da expressão da anidrase carbônica e ATP sintase mitocondrial, uma contribuição da respiração com fonte de ATP respiratório em condições de estresse hídrico, para compensar as baixas taxas de produção de ATP nos cloroplastos. E também, alteração na expressão de proteínas relacionadas com o metabolismo de nitrogênio em folhas e raízes como a glutamina sintetase, proteína 14-3-3, Vsp β também estão relacionadas com a remobilização de nitrogênio, aumentando assim o nitrogênio disponível, explicando o aumento no conteúdo de proteínas nas sementes.

A redução de enzimas associadas à via dos fenilpropanóides como as isoflavonas redutases, chalconas isomerases e deoxichalconas isomerases pode estar relacionada com a regulação negativa do metabolismo de carboidratos, e

assim uma redução na síntese de metabolitos secundários. E ainda, estas enzimas também estão relacionadas com o mecanismo de nodulação radicular.

Evidências da regulação hormonal pelo ácido jasmônico foram observadas através do aumento da expressão diferencial de fibrilinas e lipoxigenases. A alteração na expressão das enzimas peroxidases, glutamina s-transferase, 2-cys peroxidase, ascorbato peroxidase, desidrinas, HSPs, Ferritina e fatores de alongação mostraram mecanismos gerados pela planta para a detoxificação celular, prevenção da peroxidação gerada pelas espécies reativas de oxigênio, síntese de proteínas.

Nas análises de PCR quantitativo em tempo real, onde não se encontra o mesmo padrão de expressão que em análises proteômicas, mostram a ocorrência de regulação traducional ou pós-traducional, variações isoenzimáticas ou eventos de splicing alternativo.

Os meus resultados sugerem mudanças compensatórias na razão fonte-dreno uma vez que em análises fisiológicas, proteômicas e transcriptômicas de folhas e raízes observou-se alteração no metabolismo de carboidratos, na fotossíntese e no metabolismo de nitrogênio, e na expressão de proteínas envolvidas nesses processos após a aplicação do déficit hídrico contribuindo para as alterações nos conteúdos de óleo de proteínas nas sementes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHEB et al., Studies on the effect of salinity drought stress and soil type on nodule activities of *Lablab purpureus* (L.) sweet (Kashrangeeg). *Journal of Arid Environments*, v. 51, p. 587–602, 2002.

AGRAWAL, G. K. et al. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Proteomics*, v. 2, p. 947–959, 2002.

AHMED, A. et al. Comparative analysis of barley leaf proteome as affected by drought stress. *Planta*, v. 237, p. 771–781, 2013.

ALAM, I. et al. Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress. *Plant Soil*, v. 333, p. 491–505, 2010.

ALI, G. M.; KOMATSU, S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. *Journal of Proteome Research*, v. 5, p. 396–403, 2006.

ANDERSON, J. V.; DAVIS, D. G. Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. *Physiologia Plantarum*, v. 120, p. 421–433, 2004.

ARBONA, V.; GOMEZ-CADENAS, A. Hormonal modulation of citrus responses to flooding. *Journal of Plant Growth Regulator*, v. 27, p. 241–250, 2008.

AROSIO, P. et al. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1790, p. 589–599, 2009.

ASHLEY DA, ETHRIDGE MJ. Irrigation effects on vegetative and reproductive development of 3 soybean cultivars. *Agronomy Journal*, v. 70, p. 467–471, 1978.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis*. Washington, DC. 1992.

AUSTIN, J. R. et al. Plastoglobules Are Lipoprotein Subcompartments of the Chloroplast That Are Permanently Coupled to Thylakoid Membranes and Contain Biosynthetic Enzymes. *Plant Cell*, v. 18, p. 1693–1703, 2006.

BACON, M. A., et al.. Can cell wall peroxidase activity explain the leaf growth response of *Lolium temulentum* L. during dehydration? *Journal of Experimental Botany*, v. 48, p. 2075–2085, 1997.

BALL, M. et al. Applications of chlorophyll fluorescence to forest ecology. *Australian Journal of Plant Physiology*, v. 22, p. 311–319, 1994.

BAN, R. et al. Destruction of vitamin K1 of cultured cells by ultraviolet radiation and its effect on plasma membrane electron transport reactions. *International Journal of Biochemistry*, 27:449–456, 1992.

BAUWE, H.; HAGEMANN, M.; FERNIE, A.R. Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science*, 15 (6), 330-336, 2010.

BAZARGANI, M. et al. A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. *Journal of Proteomics*, v. 74, p. 1959-1973, 2011.

BECANA, M. et al. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress. *Plant Soil*, v. 201, p. 137-147, 1998.

BERGER, S. et al. Arabidopsis thaliana AtVsp is homologous to soybean VspA and VspB, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. *Plant Molecular Biology*, v. 27, p. 933-942, 1995.

BERTUCCI, A. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition studies of a coral secretory isoform by sulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 5054-5058, 2009.

BLEE, E. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science*, v. 7, p. 315-321, 2002.

BOHLER, S. et al. A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism. *Proteomics*, v. 7, p. 1584-1599, 2007.

BOHLER, S. et al. Differential impact of chronic ozone exposure on expanding and fully expanded poplar leaves. *Tree Physiology*, v. 30, p. 1415-1432, 2010.

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

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*, v. 103, p. 1035-1040, 1993.

BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, v. 2, p. 48-54, 1997.

BREVEDAN, R. E.; EGLI, D. B. Short Periods of Water Stress during Seed Filling, Leaf Senescence, and Yield of Soybean. *Crop Science*, 43: 2083-2088, 2003.

BRIAT, F. Iron dynamics in plants. *Advances in Botanical Research*, v. 46, p. 138-180, 2008.

BRIAT, J. F. et al. New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Annals of Botany*, v. 105, p. 811-822, 2010.

BROSSA, R. et al. Interplay between abscisic acid and jasmonic acid and its role in water-oxidative stress in wild-type, ABA-deficient, JA-deficient, and ascorbate-deficient Arabidopsis plants. *Journal of Plant Growth Regulator*, v. 30, p. 322-333, 2011.

BROWN, E. A., et al.. Response of selected soybean cultivars to soil-moisture deficit. *Agronomy Journal*, v. 77, p. 274-278, 1985.

- BRYLA, D. R., et al. Root respiration in citrus acclimates to temperature and slows during drought. *Plant, Cell and Environment*, v. 20, p. 1411-1420, 1997.
- CAKIR, B.; AGASSE, A.; GAILLARD, C.; SAUMONNEAU, A.; DELROT, S.; ATANASSOVA, R. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15, 2165–2180, 2003.
- CANOVAS, F. M. et al. Ammonium assimilation and amino acid metabolism in conifers. *Journal Experimental Botany*, v. 58, p. 2307–2318, 2007.
- CÁNOVAS, F. M. et al. Molecular physiology of glutamine and glutamate biosynthesis in developing seedlings of conifers. *Physiologia Plantarum*, v. 103, p. 287-294, 1998.
- CAPORALETTI, D. et al. Non-reductive modulation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by 2-Cys peroxiredoxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 355, p. 722–727, 2007.
- CARRARI, F.; FERNIE, A.R.; IUSEM, N.D. Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story. *Trends in Plant Science*, 9, 57–59, 2004.
- CARRILLO, N.; CECCARELLI, E. A. Open questions in ferredoxin-NADP⁺ reductase catalytic mechanism. *European Journal of Biochemistry*, v. 270, p. 1900-1915, 2003.
- CARUSO, G. et al. Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Science*, v. 177, p. 570–576, 2009.
- CARUSO, G. et al. Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, p. 381-390, 2008.
- CARUSO, G.; CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; GUBBIOTTI, R.; SAMPERI, R.; LAGANA, A. Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Science*, 177(6), 570–576, 2009.
- CASTILLEJO, M. A. et al. Proteomic Analysis of Responses to Drought Stress in Sunflower (*Helianthus annuus*) Leaves by 2DE Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *The Open Proteomics Journal*, v. 1, p. 59-71, 2008.
- CASTILLEJO, M. Á. et al. Proteomic Analysis of Responses to Drought Stress in Sunflower (*Helianthus annuus*) Leaves by 2DE Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *The Open Proteomics Journal*, v. 1, p. 59-71, 2008.
- CECCARELLI, E. A. et al. Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases. *Biochemistry and Biophysics Acta*, v. 1698, p. 155-165, 2004.
- CHANDLER, P. M.; ROBERTSON, M. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 45, p. 113-141, 1994.
- CHANG, I. F. et al. Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*, v. 9, p. 2967–2985, 2009.

CHAVES, M.M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103:551–660, 2008.

CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30, 239–264, 2003.

CHEHAB, E. W. et al. Distinct roles of jasmonates and aldehydes in plant-defense responses. *PLoS ONE*, v. 3, p. 1-10, 2008.

CHEN, F. et al. The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. *DNA Research*, v. 13, p. 53–63, 2006.

CHEN, H. C. et al. Drought and wound-induced expression in leaves of a gene encoding a chromoplast carotenoid-associated protein. *Plant Journal*, v. 14, p. 317–326, 1998.

CHEN, K. M. et al. Gradual drought under field conditions influences the glutathione metabolism, redox balance and energy supply in spring wheat. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 23, p. 20-28, 2004.

CHEN, X. L.; DHAUBHADEL, S. 14-3-3 proteins regulate the intracellular localization of the transcriptional activator GmMYB176 and affect isoflavonoid synthesis in soybean. *The Plant Journal*, v. 71, p. 239–250, 2012.

CHENG, Y. et al. New changes in the plasma membrane-associated proteome of rice roots under salt stress. *Proteomics*, v. 9, p. 3100–3114, 2008.

CHENPING, X.; HUANG, B. Differential proteomic responses to water stress induced by PEG in two creeping bentgrass cultivars differing in stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, v. 167, p. 1477–1485, 2010.

CHO, C.-W. et al. Molecular characterization of a 2-Cys peroxiredoxin induced by abiotic stress in mungbean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 108, p. 473–484, 2012.

CLEMENT, M. et al. Identification of new up-regulated genes under drought stress in soybean nodules. *Gene*, v. 426, p. 15–22, 2008.

CLEMENT, M. et al. The cytosolic/nuclear HSC70 and HSC90 molecular chaperones are important for stomatal closure and modulate abscisic acid dependent physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 156, p. 1481-1492, 2011.

COLELL, A.; RICCI, J. E.; TAIT, S. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell*, v. 129, p. 983–997, 2007.

COMBIER, J. P. et al. The MtMMPL1 early nodulin is a novel member of the matrix metalloendoproteinase family with a role in *Medicago truncatula* infection by *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Physiology*, v. 144, p. 703-716, 2007.

COMPAROT, S. et al. Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, v. 54, p. 595–604, 2003.

- CONROY, C. et al. Knockout of AtMKK1 enhances salt tolerance and modifies metabolic activities in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, v. 8, p. 242061-2420610, 2013.
- COSIO, C.; DURAND, C. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, p. 391–408, 2009.
- CRAMER, W. A. et al. Electron transport between photosystem II and photosystem I. *Current Topics in Bioenergetics*, v. 16, p. 179-222, 1991.
- CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 92, p. 4114–4119, 1995.
- D'ARCY-LAMETA, A. et al. Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in cowpea leaves. *Annals of Botany*, v. 97, p. 133-140, 2006.
- De Souza P.I. et al.. Water stress during seed filling and leaf senescence in soybean. *Agronomy Journal*, v. 89, p. 807-812, 1997.
- DEGENHARDT, B.; GIMMLER, H. Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. *Journal of Experimental Botany*, v. 51, p. 595–603, 2000.
- DOSS B.D., et al.. Effect of soil-water stress at various growth stages on soybean yield. *Agronomy Journal*, v. 66, p. 297-299, 1974.
- DURAND, T. C. et al. Poplar under drought: comparison of leaf and cambial proteomic responses. *Journal of Proteomics*, v. 74, p. 1396-1410, 2011.
- EDWARDS, J. et al. Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 87, p. 3459-3463, 1990.
- EJIRI, S. I. et al. Occurrence of four subunits in high molecular weight forms of polypeptide chain longation factor 1 from wheat embryo. *Journal of Biochemistry*, v. 94, p. 319–322, 1983.
- FAIT, A. et al. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology*, v. 142, p. 839-854, 2006.
- FERNIE, A.; STITT, M. On the Discordance of Metabolomics with Proteomics and Transcriptomics: Coping with Increasing Complexity in Logic, Chemistry, and Network Interactions. *Plant Physiology*, 158, 1139–1145, 2012.
- FISHER, R. F.; LONG, S. R. Rhizobium-plant signal exchange. *Nature*, v. 357, p. 655-660, 1992.
- FLEXAS J, M. H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annual Botany*, v. 89, p. 183-189, 2002.

FLEXAS, J.; GALMES, J.; RIBAS-CARBO, M.; MEDRANO, H. The effects of water stress on plant respiration. In: Lambers H, Ribas-Carbo M, eds. Plant respiration: from cell to ecosystem. Dordrecht: Springer-Verlag, 85–94, 2005.

FOURQUET, S. et al. The dual functions of thiol-based peroxidases in H₂O₂ scavenging and signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 10, p. 1565–1576, 2008.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic link between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, v. 17, p. 1866–1875, 2005.

FOYER, C.H.; NEUKERMANS, J.; QUEVAL, G.; NOCTOR, G.; HARBINSON, J. Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 63 (4), 1637–1661, 2012.

FRANCO, A. C.; LUTTGE, U. Midday depression in savanna trees: coordinates adjustments in photochemical efficiency, photorespiration, CO₂ assimilation and water use efficiency. *Oecologia*, v. 131, p. 356–365, 2002.

FRANKEL, N.; NUNES-NESI, A.; BALBO, I.; MAZUCH, J.; CENTENO, D.; IUSEM, N.D.; FERNIE, A.R.; CARRARI, F. Ci21A/Asr1 expression influences glucose accumulation in potato tubers. *Plant Molecular Biology*, 63, 719–730, 2007.

FREDERICK, J. R.; CAMP, C. R.; BAUER, P. J. Drought-Stress Effects on Branch and Mainstem Seed Yield and Yield Components of Determinate Soybean. *Crop Science*, 41: 759–763, 2001.

GALMES, J.; RIBAS-CARBO, M.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Response of leaf respiration to water stress in Mediterranean species with different growth forms. *Journal of Arid Environments*, 68, 206–222, 2007.

GAZANCHIAN, A. et al. Proteome response of *Elymus elongatum* to severe water stress and recovery. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, p. 291–300, 2007.

GILLET, B. et al. Molecular characterization of CDSP 34, a chloroplastic protein induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants, and regulation of CDSP 34 expression by ABA and high illumination. *Plant Journal*, v. 16, p. 257–262, 1998.

GOLLDACK, D. et al. Mutation of the matrix metalloproteinase At2-MMP inhibits growth and causes late flowering and early senescence in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 27, p. 5541–5547, 2002.

GONZÁLEZ, E. M. et al. The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *Journal of Experimental Botany*, v. 46, p. 1515–1523, 1995.

GRANDORI, R.; CAREY, J. Six new candidate members of the alpha/beta twisted opensheet family detected by sequence similarity to flavodoxin. *Protein Science*, v. 3, p. 2185–2193, 1994.

GYGI, S. P. et al. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, v. 19, p. 1720–1730, 1999.

- HAIJHEIDARI, M. et al. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, v. 5, p. 950–960, 2005.
- HAIJHEIDARI, M. et al. Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. *Journal of Proteome Research*, v. 6, p. 1451–1460, 2007.
- HALUSKOVA, L. et al. Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 47, p. 1069–1074, 2009.
- HAMMOND, E. T. et al. Regulation of Rubisco activation in antisense plants of tobacco containing reduced levels of Rubisco activase. *Plant Journal*, v. 14, p. 100–110, 1998.
- HAN, C. et al. Disruption of Fumarylacetoacetate Hydrolase Causes Spontaneous Cell Death under Short-day Condition in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v. 6, p. 113.216804, 2013.
- HARA, M. R.; SNYDER, S. H. Nitric oxide–GAPDH–Siah: a novel cell death cascade. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 26, p. 527–538, 2006.
- HERNÁNDEZ, I.; ALEGRE, L.; VAN BREUSEGEM, F.; MUNNÉ-BOSCH, S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants. *Trends Plant Sci* 14:125–132, 2009.
- HEWETT-EMMETT, D.; TASHIAN, R. E. Functional Diversity, Conservation, and Convergence in the Evolution of the α -, β -, and γ -Carbonic Anhydrase Gene Families. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 5, p. 50–77, 1996.
- HIRAGA, S. et al. A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell physiology*, v. 42, p. 462–468, 2001.
- HIREL, B. et al. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal Experimental of Botany*, v. 58, p. 2369–2387, 2007.
- HWANG, S. Y.; VAN-TOAI, T. T. Absciscic Acid induces anaerobiosis tolerance in corn. *Plant Physiology*, v. 97, p. 593–597, 1991.
- IBA, K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, v. 53, p. 225–245, 2002.
- IRIGOYEN, J. J. et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase, malate and alcohol dehydrogenase activities in alfalfa (*Medicago sativa*) nodules under water stress. *Physiologia Plantarum*, v. 84, p. 61–66, 1992.
- ISHIDA, A. et al. Diurnal changes in leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence in tropical tree species with contrasting light requirements. *Ecological Research*, v. 14, p. 77–88, 1999.
- JAISWAL, A. K. Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 29, p. 254–262, 2000.

- JANSSON, S. et al. A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll a/b-binding proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 10, p. 242–253, 1992.
- JEZ, J. M. et al. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 7, p. 786–791, 2000.
- Ji, K. et al. Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. *Journal of Plant Physiology*, v. 169, p. 336–344, 2012.
- Ji, W. et al. Over-expression of a glutathione S-transferase gene, GsGST, from wild soybean (*Glycine soja*) enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco. *Biotechnology Letters*, v. 32, p. 1173–1179, 2010.
- JIANG, Y. et al. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, p. 3591–3607, 2007.
- KAISER, W. The effect of hydrogen peroxide on CO₂ fixation of isolated intact chloroplasts. *Biochimica Biophysica Acta*, v. 440, p. 476–482, 1979.
- KANG, Y.; UDVARDI, M. Global regulation of reactive oxygen species scavenging genes in alfalfa root and shoot under gradual drought stress and recovery. *Plant Signaling & Behavior*, v. 7, p. 539–543, 2012.
- KASCHUK, G. et al. Differences in photosynthetic behaviour and leaf senescence of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) dependent on N₂ fixation or nitrate supply. *Plant Biology*, v. 12, p. 60–69, 2010.
- KE, Y. et al. Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 379, p. 133–138, 2009.
- KELLOS, T. et al. Stress hormones and abiotic stresses have different effects on antioxidants in maize lines with different sensitivity. *Plant Biology*, v. 10, p. 563–572, 2008.
- KICHEVA, M. I.; LAZOVA, G. N. Response of carbonic anhydrase to polyethylene glycol-mediated water stress in wheat. *Photosynthetica*, v. 34, p. 133–135, 1997.
- KIM, J. W.; DANG, C. V. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 30, p. 142–150, 2005.
- KIM, S. G. et al. Overexpression of rice isoflavone reductase-like gene (OsIRL) confers tolerance to reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum*, v. 138, 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, 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, p. 224–231, 2003.
- KO NIG, J. et al. The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, p. 5738–5743, 2002.

- KOLLER, A. et al. Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, p. 370–375, 2003.
- KONAGAYA, K. et al. Members of 14-3-3 protein isoforms interacting with the resistance gene product N and the elicitor of Tobacco mosaic virus. *Journal of General Plant Pathology*, v. 70, p. 221–231, 2004.
- KÖNIG, J. et al. The conformational bases for the two functionalities of 2-cysteine peroxiredoxins as peroxidase and chaperone. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, p. 3483–3497, 2013.
- KOSOLA, K. R.; EISSENSTAT, D. M. The fate of surface roots of citrus seedlings in dry soil. *Journal of Experimental Botany*, v. 45, p. 1639–1645, 1994.
- KOTTAPALLI, K. R. et al. Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes. *Plant, Cell and Environment*, v. 32, p. 380–407, 2009.
- LACOUR, S.; LANDINI, P. SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences. *Journal of Bacteriology*, v. 186, p. 7186–7195, 2004.
- LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LAWLOR, D. W.; TERAZA, W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany*, v. 103, p. 561–579, 2009.
- LEITNER-DAGAN, Y. et al. Expression and functional Analyses of the Plastid Lipid-Associated Protein CHRC Suggest Its Role in Chromoplastogenesis and Stress. *Plant Physiology*, v. 142, p. 233–244, 2006.
- LI, Y. C. et al. Comparative Analysis of Water Stress-Responsive Transcriptomes in Drought-Susceptible and -Tolerant Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Biology*, v. 349–360, n. 55, 2012.
- LIIVONCHANKA, A.; FEUSSNER, I. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology*, v. 163, p. 348–357, 2006.
- LISZKAY, A. et al. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, v. 217, p. 658–667, 2003.
- LIU FL. et al. A review of drought adaptation in crop plants: Changes in vegetative and reproductive physiology induced by ABA-based chemical signals. *Australian Journal Agricultural Research*, v. 56, p. 1245–1252, 2005.
- LIU, J. et al. Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *The Plant Journal*, v. 51, p. 897–909, 2007.

- LIU, T. et al. Identification of proteins regulated by ABA in response to combined drought and heat stress in maize roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 35, p. 501–513, 2013.
- LIU, T. et al. Identification of proteins regulated by ABA in response to combined drought and heat stress in maize roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 35, p. 501–513, 2013.
- LIU, Y. et al. The matrix metalloproteinase gene GmMMP2 is activated in response to pathogenic infections in soybean. *Plant Physiology*, v. 127, p. 1788–1797, 2001.
- LIVAK, K. J. Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ ct method. *Methods*, v. 25, p. 402–408, 2001.
- LUCENA, M. A. et al. Structural and physiological changes in the roots of tomato plants over-expressing a basic peroxidase. *Physiologia Plantarum*, v. 118, p. 422–429, 2003.
- LUTZ, I. A. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: [s.n.], v. 1, 1985. 533 p.
- MACKAY, V. L. et al. Gene expression analyzed by high-resolution state array analysis and quantitative proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, v. 3, p. 478–489, 2004.
- MAHLER, H. et al. Singlet oxygen affects the activity of the thylakoid ATP synthase and has a strong impact on its g subunit. *Planta*, v. 225, p. 1073–1083, 2007.
- MAHOUACHI, J. et al. Hormonal changes in papaya seedlings subjected to progressive water stress and re-watering. *Journal of Plant Growth Regulator*, v. 53, p. 43–51, 2007.
- MARINO, D. et al. Nitrogen fixation control under drought stress: localized or systemic? *Plant Physiology*, v. 143, p. 1968–1974, 2007.
- MASKIN, L.; GUBESBLAT, G.E.; MORENO, J.E.; CARRARI, F.O.; FRANKEL, N.; SAMBADE, A.; ROSSI, M.; IUSEM, N.D. Differential expression of the members of the Asr gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Science*, 161, 739–746, 2001.
- MAY, M. J. et al. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, v. 49, p. 649–667, 1998.
- MEDINA, M.; GOMEZ-MORENO, C. Interaction of Ferredoxin-NADP⁺ Reductase with Its Substrates: Optimal Interaction for Efficient Electron Transfer. *Photosynthesis Research*, v. 79, p. 113–131, 2004.
- MEISRIMLER, C. N. et al. Alteration of plasma membrane-bound redox systems of iron deficient pea roots by chitosan. *Journal of Proteomics*, v. 74, p. 1437–1449, 2011.
- MELO, P. M. et al. Expression of the plastid-located glutamine synthetase of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, v. 132, p. 390–399, 2003.
- MESQUITA, Rosilene Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2013. Determinantes fisiológicos e moleculares da resposta diferencial à seca em soja. Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Coorientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos
- MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, v. 9, p. 490–498, 2004.

- MITTLER, R.; ZILINSKAS, B. A. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant Journal*, v. 5, p. 397–405, 1994.
- MORIARTY, T. et al. Heterologous expression of maize chloroplast protein synthesis elongation factor (EF-Tu) enhances *Escherichia coli* viability under heat stress. *Plant Science*, v. 163, p. 1075–1082, 2002.
- MOWLA, S. B. et al. Yeast complementation reveals a role for an *Arabidopsis thaliana* late embryogenesis abundant (LEA)-like protein in oxidative stress tolerance. *Plant Journal*, v. 48, p. 743–756, 2006.
- MUNOZ-BERTOMEU, J. et al. *Arabidopsis* plants deficient in plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase show alterations in abscisic acid (ABA) signal transduction: interaction between ABA and primary metabolism. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, p. 1229–1239, 2011.
- MUÑOZ-BERTOMEU, J. et al. Plastidial Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Leads to Altered Root Development and Affects the Sugar and Amino Acid Balance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 151, p. 541–558, 2009.
- NANJO, Y. et al. Comparative Proteomic Analysis of Early-Stage Soybean Seedlings Responses to Flooding by Using Gel and Gel-Free Techniques. *Journal of Proteome Research*, v. 9, p. 3989–4002, 2010.
- NDIMBA, B. K. et al. Identification of *Arabidopsis* salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, v. 5, p. 4185–4196, 2005.
- NEWMAN, K. D.; VANTOAI, T. T. Molecular characterization of the soybean alcohol dehydrogenase gene family amplified in vitro by the polymerase chain reaction. *Plant Physiology*, v. 100, p. 489–495, 1992.
- NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 49, p. 249–279, 1998.
- NOURI, M.-Z.; KOMATSU, S. Comparative analysis of soybean plasma membrane proteins under osmotic stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. *Proteomics*, v. 10, p. 1930–1945, 2010.
- OLIVA, M. et al. PeroxiBase: a powerful tool to collect and analyse peroxidase sequences from Viridiplantae. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, p. 453–459, 2009.
- OREA, A. et al. Isolation of photorespiratory mutants from *Lotus japonicus* deficient in glutamine synthetase. *Physiologia plantarum*, v. 115, p. 352–361, 2002.
- OZTURK, Z. N. et al. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology*, v. 48, p. 551–573, 2002.

- PALATNIK, J. F. et al. Oxidative stress causes ferredoxin NADP(+) reductase solubilization from the thylakoid membranes in methyl viologen treated plants. *Plant Physiology*, v. 115, p. 1721–1727, 1997.
- PARKER, R. et al. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *Journal Experimental Botany*, v. 57, p. 1109–1118, 2006.
- PASSARDI, F. et al. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, v. 9, p. 534–540, 2004.
- PASSARDI, F. et al. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, v. 24, p. 255–265, 2005.
- PATRIDGE, E. V.; FERRY, J. G. WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Journal of Bacteriology*, v. 188, p. 3498–3506, 2006.
- PAUL, A. L. et al. Comparative interactomics: analysis of Arabidopsis 14-3-3 complexes reveals highly conserved 14-3-3 interactions between humans and plants. *Journal of Proteome Research*, v. 8, p. 1913–1924, 2009.
- PENHEITER, A. R. et al. Soybean root nodule acid phosphatase. *Plant Physiology*, v. 114, p. 597–604, 1997.
- PHALEN, T. J. et al. Oxidation state governs structural transitions in peroxiredoxin II that correlate with cell cycle arrest and recovery. *The Journal of Cell Biology*, v. 175, p. 779–78, 2006.
- PIQUES, M.; SCHULZE, W.X.; HOHNE, M.; USADEL, B.; GIBON, Y.; ROHWER, J.; STITT, M. Ribosome and transcript copy numbers, polysome occupancy and enzyme dynamics in Arabidopsis. *Molecular Systems Biology (Nature)*, 5(1): 314- , 2009
- PITZSCHKE, A. et al. Reactive oxygen species signalling in plants. *Antioxidant & Redox Signal*, v. 8, p. 1757–1764, 2006.
- PORTIS, A. R. Rubisco activase – Rubisco’s catalytic chaperone. *Photosynthesis Research*, v. 75, p. 11–27, 2003.
- PRICE, C. A. A nomenclature for sequenced plant genes: a brief description. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 12, p. S4–S9, 1994.
- QUIROGA, M. et al. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology*, v. 122, p. 1119–1127, 2000.
- RADWAN, O. et al. 14-3-3 Proteins SGF14c and SGF14l Play Critical Roles during Soybean Nodulation. *Plant Physiology*, v. 160, p. 2125–2136, 2012.
- RAKWAL, R.; KOMATSU, S. Absciscic acid promoted changes in the protein profiles of rice seedling by proteome analysis. *Molecular Biology Reports*, v. 31, p. 217–230, 2004.

RIBAS-CARBO, M.; TAYLOR, N.L.; GILES, L.; BUSQUETS, S.; FINNEGAN, P.M.; DAY, D.A.; LAMBERS, H.; MEDRANO, H.; BERRY, J.A.; FLEXAS, J. Effects of water stress on respiration in soybean leaves. *Plant Physiology*, 139, 466–473, 2005.

RICHARD, P.; JACOBY, A.; HARVEY, M.; TAYLOR, N.L.. Investigating the Role of respiration in Plant Salinity Tolerance by Analyzing Mitochondrial Proteomes from Wheat and a Salinity-Tolerant Amphiploid (Wheat × *Lophopyrum elongatum*). *Journal of Proteome Research*, 12, 4807–4829, 2013.

RÍPODAS, C. et al. Knock-down of a member of the isoflavone reductase gene family impairs plant growth and nodulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 68, p. 81-89, 2013.

RODRIGUEZ, R. E. et al. Transgenic tobacco plants overexpressing chloroplastic ferredoxin-NADP(H) reductase display normal rates of photosynthesis and increase tolerance to oxidative stress. *Plant Physiology*, v. 143, p. 639-649, 2007.

ROTUNDO JL; Westgate M. Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition. *Field Crops research*, v. 110, p. 147–156, 2009.

ROTUNDO RJ; Westgate, M. Rate and Duration of Seed Component Accumulation in Water-Stressed Soybean. *Crop Science*, v. 50, p. 676-684, 2010.

SALEKDEH, G. H. et al. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, v. 2, p. 1131–1145, 2002.

SALEKDEH, G. H. et al. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, v. 2, p. 1131–1145, 2002.

SANTOS, C. et al. Regulation of glutamine synthetase expression in sunflower cells exposed to salt and osmotic stress. *Scientia Horticulturae*, v. 103, p. 101–111, 2004.

SATO, Y.; YOKOYA, S. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Reports*, v. 27, p. 329-334, 2008.

SCHENKLUHNA, L. et al. Differential gel electrophoresis (DIGE) to quantitatively monitor early symbiosis- and pathogenesis-induced changes of the *Medicago truncatula* root proteome. *Journal of Proteomics*, v. 73, p. 753-78, 2010.

SCHIERMEYER, A. et al. A membrane-bound matrix-metalloproteinase from *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 is induced by bacterial pathogens. *BMC Plant Biology*, v. 9, p. 83-90, 2009.

SCHOONHEIM, P. J. et al. 14-3-3 adaptor proteins are intermediates in ABA signal transduction during barley seed germination. *Plant Journal*, v. 49, p. 289–301, 2007.

SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. (1994) Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator of rapid assessment of in vivo photosynthesis. Schulze E-D M, Caldwell MM (eds) *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin pp 49–70

SCHRODA, M. et al. A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition.. *Plant Cell*, v. 11, p. 11165–11178, 1999.

SCHWANHAUSSER, B.; BUSSE, D.; LI, N.; DITTMAR, G.; SCHUCHHARDT, J.; WOLF, J.; CHEN, W.; SELBACH, M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473: 337–342, 2011.

SEABRA, A. R. et al. *Medicago truncatula* contains a second gene encoding a plastid located glutamine synthetase exclusively expressed in developing seeds. *BMC Plant Biology*, v. 10, p. 1471-1480, 2010.

SEEBER, F. et al. The plant-type ferredoxin-NADP⁺ reductase/ferredoxin redox system as a possible drug target against apicomplexan human parasites. *Current Pharmaceutical Design*, v. 11, p. 3159-3172, 2005.

SEIDLER, A. The extrinsic polypeptides of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1277, p. 35–60, 1996.

SENGUPTA, D.; REDDY, A. R. Water deficit as a regulatory switch for legume root responses. *Plant Signaling & Behavior*, p. 914-917, 2011.

SHAO, H. B. et al. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signalling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences* , v. 4, p. 8–14, 2008.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature*, v. 1, p. 2856-2860, 2006.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 1305-1319, 2002.

SHIN, M.; ARNON, D. I. Enzymatic mechanisms of pyridine nucleotide reduction in chloroplast. *Journal of Biology Chemistry*, v. 240, p. 1405-1411, 1965.

SHINOZAKI K; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Gene networks involved in drought response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, p. 221-227, 2007.

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.

SHUNPING, Y. et al. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics*, v. 5, p. 235–244, 2005.

SILVEIRA, J. A. G. et al. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *Journal of Plant Physiology*, v. 160, p. 115-123, 2003.

SKIRYCZ, A.; INZE, D. More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion on Biotechnology*, v. 21, p. 197–203, 2010.

- SKIVER, K.; MUNDY, J. Gene expression in response to abscisic acid osmotic stress. *Plant Cell*, v. 2, p. 503-512, 1990.
- SLOT, M.; ZARAGOZA-CASTELLS, J.; ATKIN, O.K. Transient shade and drought have divergent impacts on the temperature sensitivity of dark respiration in leaves of *Geum urbanum*. *Functional Plant Biology*, 35, 1135–1146, 2008.
- SMITH PK et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v. 15, p. 76-85, 1985.
- SOARES, C. Q. G. Proteômica diferencial e caracterização fisiológica de dois clones de *Coffea canefora* sob déficit hídrico. Viçosa, UFV, 2008, 98pp (Dissertação de mestrado).
- SOBHANIAN, H. et al. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. *Proteome Science*, v. 8, p. 19, 2010.
- SOFOA, A. et al. Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. *Physiologia Plantarum*, v. 121, p. 58–65, 2004.
- SOURD, F. L. et al. eEF1B: At the dawn of the 21st century. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1759, p. 13–31, 2006.
- SPARLA, F. et al. Regulation of photosynthetic GAPDH dissected by mutants. *Plant Physiology*, v. 138, p. 2210–2219, 2005.
- SPECHT, J.E.; CHASE, K.; MACRANDER, M.; GRAEF, G.L.; CHUNG, J.; MARKWELL, J.P.; GERMANN, M.; ORF, J.H.; LARK, K.G. Soybean Response to Water. *Crop Science*, 41: 493-509, 2001.
- SRIDHAR, J. et al. Elucidation of enzymes in fermentation pathways used by *Clostridium thermosuccinogenes* growing on inulin. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 246–251, 2000.
- STAFFORD, H. A. Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiology*, v. 96, p. 680–685, 1991.
- STAFFORD, H. A. Role of flavonoids in symbiotic and defense functions in legume roots. *Botanical Review*, v. 63, p. 27–39, 1997.
- STASWICK, P. E. Novel regulation of vegetative storage protein genes. *Plant Cell*, v. 2, p. 1–6, 1990.
- STASWICK, P. E. Storage proteins of vegetative plant tissues. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 45, p. 303–322, 1994.
- STEPHENSON, L. C. et al. Specific soybean lipoxygenases localized to discrete subcellular compartments and their mRNAs are differentially regulated by source-sink status. *Plant Physiology*, v. 116, p. 923–933, 1998.
- STOLF-MOREIRA, R. et al. Identification of reference genes for expression analysis by real time quantitative PCR in drought-stressed soybean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 46, p. 58-65, 2011.

STONE, J. R.; YANG, S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxidant & Redox Signal*, v. 8, p. 243–270, 2006.

SU, P.; LI, H. Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. *Plant Physiology*, v. 146, p. 1231-1241, 2008.

SUBRAMANIAN, S. et al. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *The Plant Journal*, v. 48, p. 261-273, 2006.

SUGIHARA, K. et al. Molecular characterization of cDNA encoding oxygen evolving enhancer protein 1 increased by salt treatment in the mangrove *Bruguiera gymnorhiza*. *Plant Cell Physiology*, v. 41, p. 1279–1285, 2000.

SUNG, D.; GUY, C. Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v. 132, p. 979-987, 2003.

TABUCHI, M. et al. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, p. 2319-2327, 2007.

TALALAY, P.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T. Role of nicotinamide quinine oxidoreductase 1 (NQO1) in protection against toxicity of electrophiles and reactive oxygen intermediates. *Methods Enzymology*, v. 382, p. 355–364, 2004.

TALANO, M. A. et al. Changes in ligno-suberization of cell walls of tomato hairy roots produced by salt treatment: the relationship with the release of a basic peroxidase. *Journal of Plant Physiology*, v. 163, p. 740-49, 2006.

TEIXEIRA, J. et al. Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. desiree) plants: Cell- and organ-specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, p. 663-671, 2005.

TEZARA, W. et al. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, v. 401, p. 914-917, 1999.

TIAN, Q. et al. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 3, p. 960-969, 2004.

TRANBARGER, T. J. et al. The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxigenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. *Plant Cell*, v. 3, p. 973–987, 1991.

TROTTER, E. W. et al. The yeast Tsa1 peroxiredoxin is a ribosome-associated antioxidant. *Biochemical Journal*, v. 412, p. 73–80, 2008.

UPCHURCH, R. G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters*, v. 30, p. 967–977, 2008.

- VALDERRAMA, R. et al. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant Cell Environmental*, v. 29, p. 1449-1459, 2006.
- VARSHNEY, R. K. et al. A comprehensive resource of drought-and salinity responsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC Genomics*, v. 10, p. 1471-2164, 2009.
- VATULESCU, A. D. et al. Cloning and characterisation of a basic IAA oxidase associated with root induction in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 42, p. 609-615, 2004.
- VEAL, E. A.; DAY, A. M.; MORGAN, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular Cell*, v. 26, p. 1-14, 2007.
- VELLOSILLO, T. et al. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell*, v. 19, p. 831-846, 2007.
- VIDI, P. A. et al. Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin e accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *Journal of Biology Chemistry*, v. 281, p. 11225-11234, 2006.
- WANG, H.J.; JAUH, G.Y.; HSU, Y.H.; WANG, C.S. The nuclear localization signal of a pollen-specific, desiccation-associated protein of a lily is necessary and sufficient for nuclear targeting. *Botanical Studies (Academia Sinica)*, 44, 123-128, 2003.
- WANG, K.; JIANG, Y. Antioxidant responses of creeping bent-grass roots to water-logging. *Crop Science*, v. 47, p. 232-238, 2007.
- WANG, M. C. et al. Proteomics analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum*/*Thinopyrum ponticum*. *Proteomics*, v. 8, p. 1470-1489, 2008.
- WANG, W. et al. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, v. 218, p. 1-14, 2003.
- WANG, W. et al. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis*, v. 24(14), p. 2369-2375, 2003.
- WANG, Z.; HU, L.; HUANG, B. Diffusion limitations and metabolic factors associated with inhibition and recovery of photosynthesis from drought stress in a C3 perennial grass species. *Physiologia Plantarum*, v. 139, p. 93-106, 2010.
- WATERS, E. The Molecular Evolution of the Small Heat-Shock Proteins in Plants. *Genetics*, v. 141, p. 785-795, 1995.
- WEBER, H. Fatty acid-derived signals in plants. *Trends in Plant Science*, v. 7, p. 217-224, 2002.

- WENDELBOE-NELSON, C.; MORRIS, P. C. Proteins linked to drought tolerance revealed by DIGE analysis of drought resistant and susceptible barley varieties. *Proteomics*, v. 12, p. 3374–3385, 2012.
- WESTGATE, M. E.; GRANT, D. T. Effects of water deficits on seed development in soybean: I. Tissue water status. *Plant Physiology*, v. 91, p. 975-979, 1989.
- WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, v. 4, p. 278–286, 2008.
- WISE, M. J.; TUNNACLIFFE, A. POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science*, v. 9, p. 13-17, 2004.
- WITTENBACH, V. A. Effect of pod removal on leaf photosynthesis and soluble protein composition of field-grown soybeans. *Plant Physiology*, v. 73, p. 121-124, 1983.
- WITTENBACH, V. A. Effect of pod removal on leaf senescence in soybeans. *Plant Physiology*, v. 70, p. 1544-1548, 1982.
- WOODALL, J.; FORDE, B. G. Glutamine synthetase polypeptides in the roots of 55 legume species in relation to their climatic origin and the partitioning of nitrate assimilation. *Plant Cell Environmental*, v. 19, p. 848–858, 1996.
- WU, Y.; COSGROVE, D. J. Adaptation of roots to low waterpotentials by changes in cell wall extensibility and cell wall proteins. *Journal of Experimental Botany*, v. 51, p. 1543–1553, 2000.
- XIAOA, X. et al. Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. *Physiologia Plantarum*, v. 136, p. 150–168, 2009.
- XING, D.; WU, Y. Photosynthetic response of three climber plant species to osmotic. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 34, p. 1659–1668, 2012.
- XU, C. P.; HUANG, B. R. Root proteomic responses to heat stress in two *Agrostis* grass species contrasting in heat tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, p. 4183–4194, 2008.
- XU, C.; HUANG, B. Differential proteomic responses to water stress induced by PEG in two creeping bentgrass cultivars differing in stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, v. 167, p. 1477–1485, 2010.
- Y, O. et al. Differences in the responses of stem diameter and pod thickness to drought stress during the grain filling stage in soybean plant. *Acta Physiology Plant*, v. 31, p. 271-277, 2009.
- 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.

- YAMORI, W. et al. The Roles of ATP Synthase and the Cytochrome b6/f Complexes in Limiting Chloroplast electron Transport and Determining Photosynthetic Capacity. *Plant Physiology*, v. 155, p. 956–962, 2011.
- YAN, S.; ZHANG, Q.; TANG, Z.; SU, W.; SUN, W. Comparative Proteomic Analysis Provides New Insights into Chilling Stress Responses in Rice. *Molecular & Cellular Proteomics*, 53, 484-496, 2006.
- YANG, Y. et al. Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, p. 6061-6066, 2006.
- YOSHIMURA, K. et al. Programmed Proteome Response for Drought Avoidance/Tolerance in the Root of a C3 Xerophyte (Wild Watermelon) Under Water Deficits. *Plant Cell Physiology*, v. 49, p. 226–241, 2008.
- YOSHIMURA, K. et al. Programmed Proteome Response for Drought Avoidance/Tolerance in the Root of a C3 Xerophyte (Wild Watermelon) Under Water Deficits. *Plant Cell Physiology*, v. 49, p. 226–241, 2008.
- YOUSSEF, A. et al. Plant lipid-associated fibrillin proteins condition jasmonate production under photosynthetic stress. *The Plant Journal*, v. 61, p. 436–445, 2010.
- YTTERBERG, A. J. et al. Protein Profiling of Plastoglobules in Chloroplasts and Chromoplasts. A Surprising Site for Differential Accumulation of Metabolic Enzymes. *Plant Physiology*, v. 140, p. 984-997, 2006.
- ZHEN et al. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. *Physiologia Plantarum*, v. 4, p. 542-554, 2007.
- ZHOU, S. et al. Proteome changes induced by aluminium stress in tomato roots. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, p. 1849–1857, 2009.
- ZOZAYA-GARZA, M.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Glutamine synthetase gene isolation from an alfalfa leaf cDNA library. *Plant Physiology*, v. 119, p. 1568-1573, 1999.
- ZUK, M. et al. 14-3-3 protein down-regulates key enzyme activities of nitrate and carbohydrate metabolism in potato plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 3454–3460, 2005.

CAPÍTULO 2

EFEITO DO DÉFICIT HÍDRICO EM PLANTAS DE SOJA DURANTE O ESTÁGIO REPRODUTIVO

INTRODUÇÃO

A produção da soja está entre uma das principais alavancas do agronegócio brasileiro contribuindo para o desenvolvendo econômico do país. Oferece uma fonte estável de materiais para indústria de alimentos e não alimentícias, existindo assim uma grande demanda por variedades de soja com alto conteúdo de proteína/óleo nas sementes para suprir o mercado (Hilton et al., 2013).

Desde a década de 1980, o Programa de Melhoramento da Qualidade e do Sabor da Soja do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa vem trabalhando no desenvolvimento de cultivares de soja mais adequadas para uso na agroindústria. No entanto, com o crescente interesse no uso da soja como fonte de óleo para a produção de biodiesel, o referido programa tem também orientado os seus esforços para a criação de cultivares de soja com elevado conteúdo de óleo e com composição modificada de ácidos graxos. Entretanto, o conteúdo total de óleo e proteína parece ser bastante afetado por fatores ambientais.

As plantas estão submetidas a uma série de estresses abióticos e bióticos que afetam seu crescimento e desenvolvimento. Os efeitos de vários fatores ambientais interferem com a desenvolvimento das plantas, e a restrição por água é um dos principais fatores que contribuem para o insucesso da produção de soja (Lisar et al., 2012; Wang, 2003). Porquanto, o déficit hídrico pode afetar a utilização de carboidratos, por alterar a eficiência com que os fotoassimilados são convertidos para o desenvolvimento de partes novas na planta (Talor, 1983).

O presente trabalho teve por objetivo auxiliar os trabalhos de melhoramento genético para conteúdo de óleo e proteína utilizando principalmente a proteômica diferencial como instrumento para uma melhor compreensão dos processos

envolvidos no acúmulo diferencial destes componentes nas sementes sob condições de déficit hídrico.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal, condições de cultivo e delineamento experimental

Foi utilizada a variedade UFVTN105-AP da espécie *Glycine max*, obtida pelo Programa de melhoramento da UFV, possui 15,90% de óleo e 45,25% de proteína, tendo grupo de maturação semi-tardio, e crescimento determinado. As plantas utilizadas nos experimentos de déficit hídrico foram cultivadas em casa de vegetação do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa, contendo sistema de monitoramento de temperatura. As sementes foram plantadas em vasos de 5 litros preenchidos com 4,5 kg de solo, esterco e areia, na proporção de 3:1:1 (v/v/v), adicionado a estas a mistura NPK 4:14:8, super simples, calcário e cloreto de potássio. Após 10 dias de germinação as plântulas foram irrigadas com solução de inoculação 20 mL/L (v/v) com bactéria específica para a soja, denominada *Bradyrhizobium japonicum*. As plantas receberam irrigação contínua na capacidade de campo até a aplicação do estresse hídrico. O estresse hídrico foi imposto no período de desenvolvimento reprodutivo, na passagem do período R4 para o período R5. O estágio R4 caracteriza-se pela frutificação plena, onde a maioria das vagens no terço superior da haste principal está com comprimento de 2 a 4 cm. O estágio R5 se caracteriza pelo início da formação da semente ou início da granação, ou seja, a partir deste estágio torna-se perceptível ao tato ou a visão o preenchimento das vagens (enchimento dos grãos) através do acúmulo progressivo de matéria seca na forma de grãos. A fase R5 está subdividida em cinco etapas de acordo com classificação da empresa *Stoller*®.

As plantas foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle, capacidade de campo máxima do solo) ou submetidas ao déficit hídrico, imposto pela manutenção de 40% de água disponível no solo, sendo o potencial hídrico na antemanhã (Ψ_{am}) medido diariamente para acompanhar a situação de estresse nestas plantas. Foram realizadas medições do potencial hídrico (antemanhã), trocas gasosas (taxas fotossintética e da condutância estomática) e parâmetros da fluorescência em folhas no intervalo de três dias. Amostras de folha e raiz foram coletadas ao final do período de estresse, e imediatamente armazenadas em

nitrogênio líquido a -80 °C para posteriores análises. Foram plantadas 20 plantas sendo estas divididas em 10 plantas submetidas ao tratamento e 10 plantas submetidas à situação controle. Destas 10 plantas, 5 foram destinadas a coleta de folha e raízes no final no estresse hídrico de -1,5 MPa. As outras 5 plantas, após o déficit hídrico de -1,5 MPa, foram re-irrigadas e acompanhadas até o final do desenvolvimento reprodutivo (maturidade fisiológica) para a coleta das sementes maduras (R8).

Análises fisiológicas

O potencial hídrico foliar (Ψ_H) foi determinado em folhas completamente expandidas, por meio de uma bomba de pressão do tipo Scholander, na antemanhã, conforme descrito por DaMatta et al. (1997). A medida de condutância estomática ao vapor de água (g_s) foi determinada em sistema aberto, sob luz saturante, por volta das 08:00 h, com um analisador de gases a infravermelho portátil (LCA-4, ADC, Hoddesdon, Reino Unido). A taxa de assimilação líquida de carbono (A) foi determinada em sistema aberto sob luz saturante por volta das 08:00 h com um analisador de gases a infravermelho portátil (LCA-4, ADC, Hoddesdon, Reino Unido).

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram medidos nas mesmas folhas utilizadas para medições de trocas gasosas por meio de um fluorômetro com amplitude de pulso modulado (PEA, Hansatech, Norfolk, Reino Unido), segundo Schreiber et al. (1995). As medições realizadas na antemanhã determinaram a fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável ($F_v = F_m - F_0$), e eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII) (F_v/F_m), parâmetros estes determinados em condições de escuro. Às 8:00 h foram determinados as variáveis de fluorescência constante (F_s') e fluorescência máxima (F_m'), parâmetros determinados em condições de luminosidade. Folhas adaptadas ao escuro por 30 min foram iluminadas com pulsos de luz vermelha de baixa intensidade e frequência para obtenção da fluorescência inicial (F_0). Um pulso de luz saturante de pulso de 6000 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ foi aplicado por um segundo para medir a emissão de fluorescência máxima (F_m). Com esses parâmetros foi estimado o rendimento quântico efetivo através do $\text{FSII}_{\text{ef}} = (F_m' - F_s')/F_m'$, conforme Genty et al., 1989. O coeficiente de extinção fotoquímica (q_p),

foi determinado segundo Schreiber et al. 1994. Foi estimada F_0 adaptada a luz $F_0' = F_0 / (F_v/F_m + F_0/F_m')$, de acordo com Oxboroug & Baker (1997). O coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ) foi determinada pela equação onde $NPQ = (F_m/F_m') - 1$, segundo Krause & Weiss (1991). A fração de irradiância não utilizada na fase fotoquímica nem dissipada termicamente foi determinada como $PE = (F_v'/F_m') * (1 - qp)$, segundo Demming-Adams et al. (1996). A taxa de transporte de elétrons foi calculada segundo a fórmula $ETR = \Phi F_{SII} \times 0,5 \times FFF \times AL$, onde AL é a absorbância luminosa para *Coffea* sp. (Dias, 2006), e FFF é a intensidade de fluxo fotônico $1000 \mu\text{mol de fótons. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, e 0,5 a fração de energia distribuída para o PSII. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa SAS ("Statistical Analysis System") versão 8.0 pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Extração de proteínas de folhas e de raízes

A extração de proteínas de folhas de soja foi feita em triplicata, com base em protocolo proposto por Wang et al. 2003. Aproximadamente 2,5g de amostra foi macerado em nitrogênio líquido, em almofariz e pistilo. Em seguida, foram acrescentados 15 mL de uma solução contendo PVPP 1% (*polyvinylpolypyrrolidone*), beta-mercaptoetanol 2%, PMSF 1mM (*phenylmethysulphonylfluoride*) e acetona gelada. A mistura foi agitada e sonicada à potência de 30% da potência máxima do aparelho *UltraSonic Processor* (Modelo GE 50) (amplitude de 70 dB), centrifugada a 6000 *g*, a 4º C. Na sequência, o precipitado (*pellet*) foi lavado sucessivamente em acetona, TCA 10% (ácido tricloroacético) em acetona, TCA 10% (ácido tricloroacético) em água, acetona 80% e etanol 80%. As lavagens foram seguidas por centrifugação a 6000 *g*, a 4º C. Ao final do processo, o precipitado foi seco a temperatura ambiente e armazenado a -80ºC. Em uma segunda etapa, 10 mL do tampão SDS (sulfato de dodecil sódio) denso (sacarose 30%; SDS 2%; Tris-HCl 0,1M, pH 8,0; β-mercaptoetanol 2%; PMSF 1mM) foi acrescentado ao pó obtido na etapa anterior e a mistura foi agitada. Em seguida, foi acrescentado 5 mL de fenol tamponado pH 8,0 e, após agitação a mistura foi centrifugada a 6.000 *g*, a 4 ºC. Foi descartado o sobrenadante, e o precipitado ressuspenso pela adição de 20 mL de acetato de amônio 0,1 M em metanol gelado e a mistura foi centrifugada a 6.000 *g* a 4 ºC. Em seguida, o precipitado foi lavado na seguinte sequência: acetato de amônio 0,1 M em metanol,

acetona 80%, etanol 70%. Todas as lavagens foram seguidas de centrifugação a 6.000 g, a 4 °C. Finalmente, o precipitado foi seco à temperatura ambiente, solubilizado com tampão de amostra (Uréia 7M, Tiouréia 2M e CHAPS 4% (3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate)), sonicado a 10% da potência máxima do aparelho UltraSonic Processor (Modelo GE 50) (amplitude de 70 dB), e armazenado a -80 °C.

Quantificação de proteínas e análise do perfil proteico

A concentração proteica nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A eficiência da extração foi determinada pela integridade do perfil proteico (ausência de rastros de degradação por proteases). Foram feitas análises de pureza das amostras e presença de degradação em gel SDS-PAGE (Laemmli, 1970). As amostras proteicas foram desnaturadas a 95°C por 5 min e resolvidas em gel SDS-PAGE 12% (40 µg de proteína por linha). Os géis SDS-PAGE foram corados com azul de coomassie R-250.

Eletroforese bidimensional

Para o gel bidimensional, na primeira dimensão ou focalização isoeletrica (IEF) foram usadas fitas de 18 cm e pH 4–7 (GE Healthcare) que foram reidratadas de 14-20 h em 500µl de tampão de reidratação (Uréia 8M, CHAPS 2%, Azul de bromofenol 0.002%, IPG-buffer 2%, DTT 0.2%) juntamente com 800µg de proteína em aparato de reidratação IPGBOX (GE Healthcare). A IEF realizada no IPGphor III (GE Healthcare, Upsala, Suécia) a 20°C, segundo recomendação do fabricante para tiras de 18 cm, 4-7 pH. A amperagem máxima foi de 50µA por tira. Para a análise da segunda dimensão, as fitas foram equilibradas por 15 min em 10 mL de solução de equilíbrio (Uréia 6M, Glicerol 30 %, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002%, 50 mM de Tris pH 8.8) contendo 100 mM de DTT e 250 mM de iodoacetamida. A separação da segunda dimensão realizada no *Protean Daltsix* (GE Healthcare Upsala, Suécia) com espaçadores de 1,5 mm em gel de poliacrilamida 12%. As condições da eletroforese foram 30 min 15 mA/gel, 6 h 30 mA/gel, e marcador molecular do tipo "Low Molecular Weight" para eletroforese (GE Healthcare).

Análise da imagem e quantificação

Os géis foram corados pela adição de azul de coomassie G-250 coloidal 0,02% por 72 h, e fixados três vezes em solução contendo ácido fosfórico 2% e etanol

30% por 30 min. Em seguida, enxaguado três vezes em ácido fosfórico 2% por 20 min, e incubado em solução contendo etanol 18%, sulfato de amônio 15% e ácido fosfórico 2% por 30 min e mantidos em solução de ácido acético 1% até a digitalização. Os géis corados foram escaneados e calibrados com o programa *Labscan* (GE Healthcare). As análises de imagem foram realizadas no *ImageMaster 2D platinum* (GE Healthcare). Nas análises foram considerados spots diferencialmente expressos aqueles que apresentaram uma variação na porcentagem de volume entre os tratamentos de 1,5 vezes ou mais em pelo menos três géis, contendo proteínas oriundas de extrações e réplicas biológicas independentes, e ANOVA ($p < 0,05$).

Extração peptídica

Os *spots* excisados dos géis foram transferidos para microtubos de 0,6 mL e digeridos com a enzima tripsina (Trypsin gold, mass spectrometry grade, Promega). A digestão foi realizada segundo protocolo de digestão trípica estabelecido por Shevchenko (Shevchenko et al, 2006), onde os pedaços de géis excisados são descorados em 3 lavagens com solução de acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,0. Após a segunda lavagem, deixa *overnight* sob agitação constante, e por último a terceira lavagem. A acetonitrila foi removida e o gel foi desidratado com 200 μ L de acetonitrila (100%). Remove-se a acetonitrila e seca os géis no vácuo por 15 minutos. Os pedaços de gel foram reduzidos em 100 μ L de DTT 65 mM por 30 minutos, à temperatura de 56 °C. Posteriormente alquilados com 100 μ L de iodoacetamida 200 mM, por 30 min à temperatura ambiente, lavados com solução de bicarbonato de amônio 100 mM por 10min e desidratados com 200 μ L de acetonitrila por 5 minutos. A acetonitrila foi removida e feita nova reidratação com 200 μ L de bicarbonato de amônio 100 mM, seguido de duas etapas de desidratação com 200 μ L de acetonitrila 100%. Após remoção da solução de acetonitrila, os géis foram secos à vácuo por 15 minutos. Foram adicionados 20 μ L de uma solução de tripsina 25 ng μ L⁻¹ por 45 minutos no gelo. Em seguida, foi adicionada uma solução de 50 μ L de bicarbonato de amônio 40 mM em acetonitrila 10%, *overnight* à 37 °C. As amostras constituídas de peptídeos obtidos por digestão trípica foram purificadas e dessalinizadas utilizando ponteiras de 0,6 μ L ZipTip® com resina C₁₈ (Millipore) segundo o protocolo do fabricante. Primeiramente, as ponteiras ZipTip® C₁₈ foram lavadas

com uma solução de acetonitrila 100% , usando o volume máximo de 10 µL da ponteira, certificando-se de que foram feitas 10 lavagens, dispensando sempre a solução após cada lavagem. Após a etapa de carregamento, as ponteiras foram lavadas com solução de ácido trifluoroacético 0,1%, aspirando e dispensando a solução cerca de 10 vezes. Em um microtubo contendo 1,5 µL de solução de acetonitrila 50% em ácido trifluoroacético 0,1%, os peptídeos foram eluídos aspirando e dispensando a amostra 10 vezes dentro do mesmo microtubo.

Análise por espectrometria de massas

As amostras foram aplicadas na proporção 1:1 de amostra e ácido α -ciano-4-hidrocinâmico em 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético. Os fragmentos resultantes da digestão trípica foram analisados no intervalo de 800–3500 Da no instrumento SCIEX TOF/TOF™ 5800 System (*Applied Biosystems*) do Laboratório de Toxinologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), tanto no modo MS quanto MS/MS, com intervalo de confiança monoisotópica de 0,1 Da. Os peptídeos foram identificados usando o algoritmo de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF), e algoritmo *MS/MS Ion Search*, ambos contidos no programa Mascot 4®, utilizando como parâmetros: peptídeos com até dois sítios de clivagem, erro de 0,1 Da, e como modificações variáveis a carbamidometilação dos resíduos de cisteína, oxidação dos resíduos de metionina e deaminação dos resíduos de asparagina e glutamina. Para visualização dos espectros, organização e validação de todos dados gerados foi utilizando o software SCAFFOLD® (*Confident protein identification*, ©2006 Proteome Software Inc), usando 95% de filtro de probabilidade para proteínas e peptídeos, e ainda foi considerado a porcentagem de cobertura de cada proteína.

Extração, purificação de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA total das folhas de soja foi realizada com o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. Para cada tratamento foram feitas três extrações individuais de amostras de 100 mg de folhas e 100mg de raiz. Após extração, foi determinada a concentração de RNA total no espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Rockland, DE, EUA) e a qualidade do RNA foi avaliada pela integridade das bandas do RNA ribossômico em gel de agarose 1,5%. A pureza foi determinada pela razão das absorbâncias a 260 nm e 280 nm. A seguir, o RNA total foi tratado com DNase

RNAse Free (Promega, Madison, EUA), seguindo as recomendações do fornecedor. As amostras foram novamente quantificadas e avaliadas quanto à integridade, como descrito anteriormente. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 1 µg do RNA total, utilizando a transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o *primer* Oligo(dT)¹²⁻¹⁸ (Sigma Aldrich, São Paulo, SP), de acordo com as recomendações dos fornecedores.

Análise da expressão de genes via qRT-PCR

Os genes utilizados foram escolhidos pelos resultados apresentados através da proteômica diferencial, e verificando a provável localização desses genes em rotas metabólicas de resposta a estresses abióticos. Na Tabela 1, está representada a sequência dos “primers” que foram desenhados pela ferramenta *Primer Blast* presente no site NCBI. Os números de acesso descritos foram obtidos pela busca de similaridade das sequências das proteínas obtidas através de espectrometria de massa com as sequências de proteínas depositadas nos bancos de dados Phytozome (<http://www.phytozome.net/soybean>) com a espécie *Glycine max*, e no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com virideaplantae.

A quantificação relativa foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$, uma modificação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK, 2001), e o acúmulo dos transcritos de cada gene foi normalizada tomando como referência a expressão constitutiva dos genes Gmβ-actin e GmRNAr18S (STOLF-MOREIRA, LEMOS, *et al.*, 2011). As reações de amplificação continham 90 ng de cDNA, 10,0 µL de 2X SYBR® *Green Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e *primers* na concentração de 200 nM. As condições de amplificação foram: duas etapas iniciais (50 °C por 2 min e 95 °C por 10 min) e 40 ciclos a 95 °C por 30 s e 60 °C por 30 s. A curva de dissociação foi verificada após a amplificação para certificar que apenas um único *amplicon* havia sido produzido em cada reação. As reações foram realizadas no termociclador SDS ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amostras foram analisadas em triplicata. Posteriormente foram realizadas as análises pela ANOVA para todas as variáveis respostas. Os métodos foram analisados utilizando-se o programa SAS (“Statistical Analysis System”) versão 8.0 e as diferenças das médias dos níveis de estresse comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Tabela 1. Lista de *primers* usados no qRT-PCR para a avaliação da expressão diferencial dos genes do genótipo UFVTN105AP submetida à condições de déficit hídrico.

PROTEÍNA	Número de acesso no site NCBI	Orgão	Primer forward 5'-3'	Primer reverse 5'-3'
Gmβ-Actina [Glycine max]	GI:1498333	folha/raiz	GAGCTATGAATTGCCTGATGG	CGTTCATGAATTCAGTAGC
GmRNAr18S [Glycine max]	GI:18729	folha/raiz	AAACGGCTACCACATCCAAG	CCTTCAATGGATCCATCGTTA
Ascorbato Peroxidase [Glycine max]	gil351726325	folha	CTTGACATCGCTGTTAGGCT	TCCAGGATGGAAGGGAACCTT
Glutamina sintetase [Glycine max]	gil13877511	folha	AGACAGCAAGCATCAACACA	CTCTCCACACGGATTGAG
Complexo de evolução do oxigênio 2 [Glycine max]	gil356567470	folha	AGCAACAGTGAAAGATGGCA	TTGCTGTGCTCTCCACAAAT
Transcetolase [Glycine max]	gil356576867	folha	TCAACCGTGACCGTTTCATT	GTATAGCCTGCAAGGTGAA
Ferredoxina-NADP redutase [Glycine max]	gil356559282	folha	TTTTGGGTGTCCTACAAGC	CCGTTCTCGTTTGTTCGTC
Anidrase carbônica [Glycine max]	gil356571334	folha	CCTCTTCCATTAACGGGTGG	GACAGAAGGGCCTAATGTGG
Metaloendoproteínase [Glycine max]	gil351724817	folha	GTTTGGCATGATCTCGGACT	CGCGCTTTTGAAGTGTCTAT
Rieske [Glycine max]	gil356549980	folha	GACCTGCTCCATTGTCTCTG	AGGAACAACACGACCTTCC
Proteína do sistema coletor de luz - Lhc3 [Glycine max]	gil356554088	folha	ACCCACTTGGCTTTGGTAAG	TTGCCAACATAGCCAACCTT
Quinona oxidoreductase [Glycine max]	gil363808268	folha	TACTCTCTACTGATGGGGCG	GGCTTCAGCTTACCACCTCTC
Abscísic stress ripening protein [Glycine max]	gil351722069	folha	ACAACACATCATATCCAAGCC	TGGCTTGTGTGAACACAGAGT
Aldo-keto redutase [Glycine max]	gil356504240	folha	CCAGCAGCTCTCAAAAGTGA	TGCTTGTGTCTTCCCCAATC
Fosfoglicerato cinase [Glycine max]	gil356557028	folha	GGTTGTCAAGGCTGAAGACA	CATCTGGAAGAGAAGCCACC
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase [Glycine max]	gil356561064	folha	GACCTCGTTGTTTCAGGTCTC	GCTCATCACACAGAGAGG
Deidrina [Glycine max]	gil359807014	folha	GACTTTGACCTTGGCCTCAA	CACGAGCTTTCAGATTGG

Determinação dos conteúdos de óleo e proteína

A determinação da concentração de óleo total nas sementes em desenvolvimento foi realizada utilizando aparelho extrator de Soxhlet e éter de petróleo como solvente, segundo os procedimentos descritos em Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (Lutz, 1985). Os resultados foram expressos com base na matéria seca, obtida pela secagem em estufa a 105° C, por 24 horas.

Para determinação de proteínas totais, foi utilizado o método de Kjeldahl, descrito pela *Association of Official Analytical Chemistries* (1992), com modificações. O conteúdo de proteína e óleo nas sementes também foi determinado em um espectrômetro infravermelho FT-NIR (Antaris II FT-NIR Analyzer Thermo Scientific). As sementes foram trituradas em um moinho para proporcionar granulometria adequada para a leitura do espectro no equipamento FT-NIR.

As diferenças entre os tratamentos foram estatisticamente diferentes segundo t-test de Student's ($p < 0.05$) realizado pelo software Genes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Status hídrico, trocas gasosas e parâmetros de fluorescência da clorofila *a*

Neste estudo, plantas do genótipo UFVTN105AP de *Glycine max* foram submetidas as condições de plena irrigação e não irrigadas (Figura 1). Nas plantas controle (irrigadas) o potencial hídrico foliar foi sempre superior à -0.05 MPa, e nas plantas não irrigadas o potencial hídrico foi de - 1,64 MPa, valor em que foram coletados folhas para as análises (Figura 2).

Foi observado um declínio na taxa fotossintética, na condutância estomática, e na razão C_i/C_a nas plantas não-irrigadas como era esperado para plantas submetidas às condições de déficit hídrico (Tabela 2). Sabe-se que em condições de déficit hídrico a fotossíntese pode ser afetada por mecanismos estomáticos. Em outros trabalhos, durante o estágio reprodutivo, no período de enchimento de grãos (R5) os valores de fotossíntese líquida (A) estão entre 23.4 e 14 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ em condições de plena irrigação, e podem apresentar um declínio entre 4 e 10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dependendo do período de déficit hídrico em que se encontram (Nakayama *et al.*, 2009; Kaschuk *et al.*, 2010).



Figura 1. Plantas de soja da variedade UFVTN105AP submetidas ao déficit hídrico no estágio R5 em comparação com o controle.

Em condições de déficit hídrico, pode ocorrer uma modulação na expressão de proteínas dos fotossistemas promovendo uma redução na captação de energia, pois um eficiente controle dos mecanismos fotoquímicos, não-fotoquímicos, ajustamento na partição do fluxo de elétrons em processos assimilativos e não-assimilativos minimizam os danos nos fotossistemas (Franco; Luttge, 2002), fato este explicado pela redução na taxa de transporte de elétrons sob condições de déficit hídrico (Tabela 2).

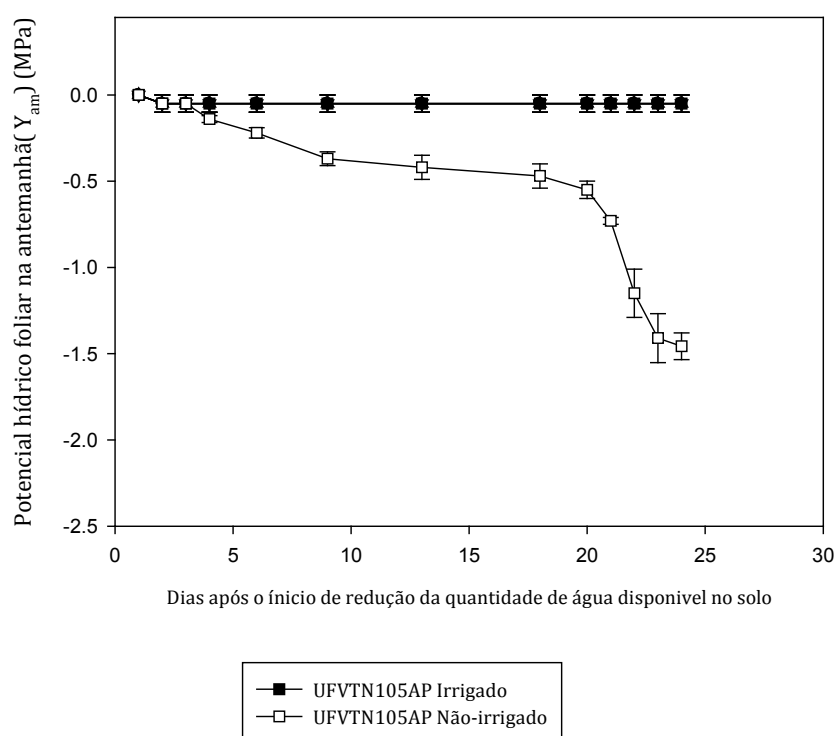


Figura 2. Perfil temporal do potencial hídrico foliar na antemanhã da variedade UFVTN105AP submetida ao déficit hídrico. Os pontos representam a média + erro padrão (n=6, onde n representa o número de plantas. I = irrigado, NI = não-irrigado).

Segundo, Ball e colaboradores (1994) o funcionamento do fotossistema II (PSII) é um indicador muito sensível identificar estresses em plantas (Ball, *et al.*, 1994). Portanto, o declínio no rendimento quântico do transporte de elétrons no fotossistema II (ϕ PSII) sob condições de déficit hídrico neste experimento mostra a efetividade do tratamento aplicado (Tabela 2). Um ligeiro declínio de F_v/F_m foi observado sob condições de déficit hídrico, mas os valores ainda assim

continuaram dentro do limite considerado como ótimo (~ 0.800), indicando que a fotoinibição não ocorreu.

Tabela 2. Efeito do potencial hídrico foliar na antemã (Ψ_H - 1,5 MPa) sobre parâmetros fisiológicos da variedade UFVTN105AP submetida às condições de déficit hídrico durante estágio reprodutivo (R4-R5). Taxa fotossintética (A) (mol m⁻²s⁻¹), condutância estomática (gs) (mmol.m⁻².s⁻¹), razão entre concentração CO₂ interno e ambiente (Ci/Ca), Eficiência fotoquímica máxima do PSII (Fv/Fm), rendimento quântico do transporte de elétrons no PSII (φPSII), Coeficiente de quenching fotoquímico (q_N), fração da energia absorvida não utilizada na fase fotoquímica nem dissipada termicamente (PE), taxa de transporte de elétrons (ETR) e coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ). Os dados representam a média ± erro padrão (n=10, onde n representa o número de plantas).

Parâmetros	UFVTN10AP		
	Irrigado	Não-irrigado	
Ψ _H	-0.05 ±2.31E-18	-1.64 ±0.07	**
A	15.79 ±0.83	5.60 ±1.25	**
gs	269.74 ±25.05	61.11 ±13.70	**
Ci/Ca	0.71 ±0.02	0.59 ±0.02	**
Fv/Fm	0.83 ±0.005	0.81 ±0.004	ns
φPSII	0.29 ±0.01	0.19 ±0.01	**
qp	0.45 ±0.03	0.31 ±0.01	**
Pe	0.36 ±0.03	0.42 ±0.02	ns
ETR	131.55 ±6.13	85.33 ±4.41	**
NPQ	1.54 ±0.16	1.86 ±0.22	ns

O asterisco denota diferença significativas, segundo teste Tukey (**P< 0.01 ou *P<0.05).

A redução no coeficiente de *quenching* fotoquímico (q_p), o aumento na fração da energia absorvida não utilizada na fase fotoquímica nem dissipada termicamente (PE) mostram que os mecanismos de dissipação do excesso de energia não devem estar sendo mais eficientes para drenar o excesso de poder redutor. Entretanto, o aumento observado no coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ) pode estar relacionado com um processo de proteção contra danos causados nas folhas em função do excesso de energia (Maxwell; Johnson, 2000).

Análise do proteoma diferencial em folhas do genótipo UFVTN105AP por espectrometria de massa

Na análise do proteoma diferencial de folhas do genótipo UFVTN105AP por eletroforese bidimensional foram encontrados 32 spots diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico (Figura 3). Destes, 21 foram identificados por espectrometria de massas no modo MS/MS (Tabela 3). A Figura 2 mostra o perfil de proteínas de folhas no genótipo UFVTN105AP quando submetidos às condições irrigadas (controle) e não-irrigadas (tratada) durante o período reprodutivo R4-R5. Dentro os spots identificados estão aqueles que têm a correspondência entre as repetições dentro do mesmo tratamento e entre diferentes tratamentos, e os que somente aparecem em uma condição, controle ou tratado.

A Tabela 3 contém os dados referentes a abundância relativa de cada spot em condições irrigadas e não-irrigadas. A Tabela 4 mostra a identificação dos spots indicados na Figuras 3 através da espectrometria de massas utilizando-se o MASCOT MS/MS *ion search*, assim como apresenta também outros dados como o número de acesso no *National Center for Biotechnology Information*, e-value, ponto isoelétrico e massa teórica determinadas no *Protein Prospector*, ponto isoelétrico e massa experimental determinadas pelo *Image Master 2D Platinum* e porcentagem de cobertura obtida no software *Scaffold* (Proteome Software, Inc., Portugal, OR).

HSPs (Heat-Shock Proteins)

Neste trabalho, foi evidenciado o aumento na expressão de uma HSP 70 KDa (spot 37) e de uma HSP 18.5 KDa (spot 64) em plantas em condições de déficit hídrico (Tabela 3 e Figura 3). A homologia e o peso molecular são as características principais adotadas para divisão em classes. As *heat-shock-proteins* (HSPs), também chamadas de chaperonas moleculares, encontram-se localizadas em diversos compartimentos subcelulares como citossol, retículo endoplasmático, plastídeos e mitocôndrias (SUNG e GUY, 2003). As chaperonas que apresentam massa molecular menor que 30 KDa são chamadas de *Small-Heat-SHock-Proteins* (sHSPs) e são divididas em 4 classes de acordo com a localização celular e similaridade de sequências (Waters, 1995).

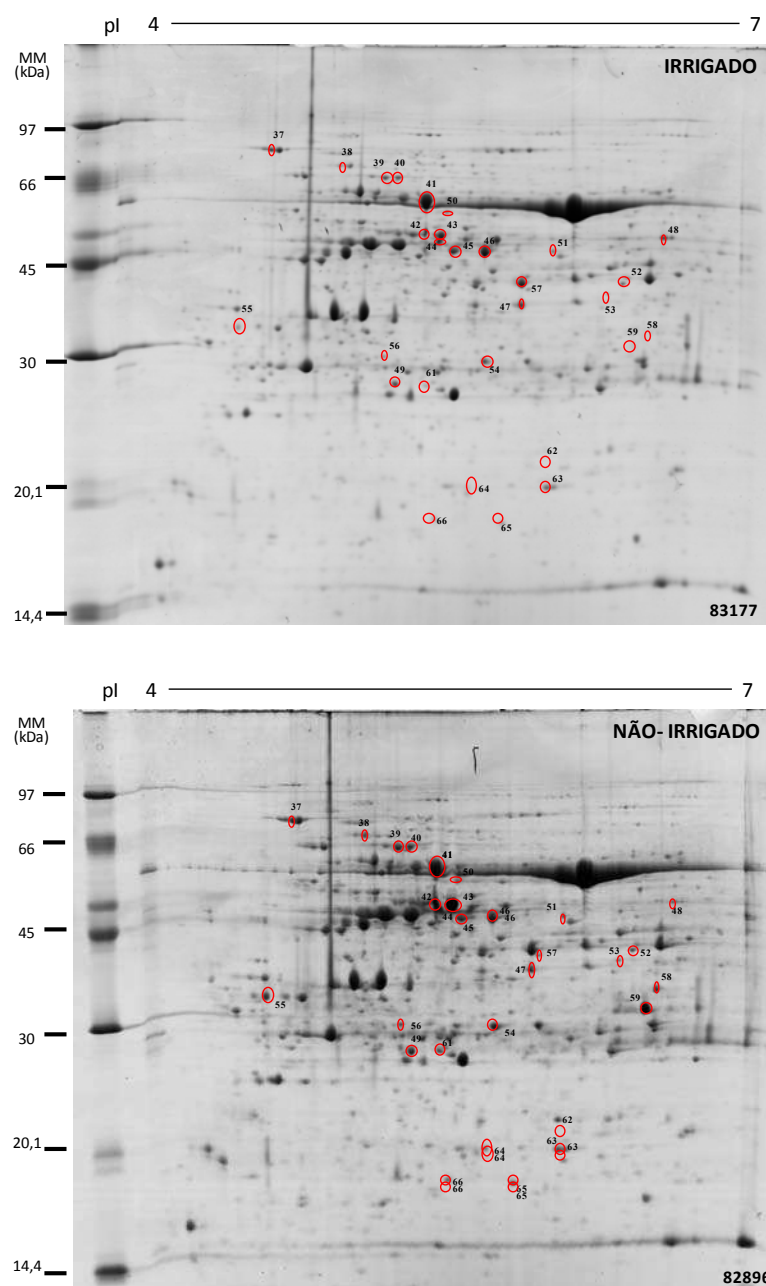


Figura 3. Perfil de proteínas de folhas na variedade UFVTN105AP submetidas às condições de déficit hídrico no período reprodutivo (R4-R5). Proteínas com expressão diferencial estão circuladas em vermelho e identificadas com número correspondente. Foi utilizado 1000µg de proteínas para a eletroforese bidimensional. As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH4-7 para posterior separação por SDS-PAGE, e assim coradas com azul de coomassie para proceder a análise diferencial no software *Image Master 2D platinum*

As HSPs como um grupo de proteínas que são induzidas em condições de estresse com a função de proteção e reparo de danos causados nestas condições (Liu *et al.*, 2007; Su; Li, 2008; Sato; Yokoya, 2008). Existem evidências de que a HSP 70, encontrada no estroma dos cloroplastos, participe na fotoproteção e no reparo do fotossistema II durante e depois da fotoinibição (Schroda *et al.*, 1999). Alguns autores mostraram que as Hsp 70 e Hsp 90 são requeridas para o fechamento estomático e ainda para as respostas transcricionais e fisiológicas moduladas pelo ABA (Clement *et al.*, 2011). As chaperones moleculares apresentam função na desagregação e degradação proteica onde removem polipeptídeos decorrentes de mal dobramento, desnaturação ou agregação, e portanto sendo esta função importante para a manutenção da homeostase celular.

Chaperoninas

Em relação a expressão da proteína chaperonina observou-se um aumento em duas proteínas desta classe, chaperonina 60 (spot 40) e chaperonina 20 (spot 56) nas plantas não-irrigadas em relação às plantas irrigadas (Tabela 3 e Figura 3). As chaperoninas do tipo I funcionam com uma excelente maquinaria de processamento protéico, e são conhecidas como GroEL-GroES em *E. coli*, chaperoninas 60-10 (Cpn60 até Cpn10) em cloroplastos, e Heat shock protein 60-10 (HSP60-HSP10) nas mitocôndrias (Gruber *et al.*, 2013).

A função das chaperoninas no processamento/dobramento proteico de proteínas envolvidas no aparato fotossintético têm sido demonstrada (Ellis, 1990; Peng, 2011; Ishikawa, 2003; Chen; Jagendorf, 1994). As condições de déficit hídrico causam mudanças no metabolismo celular, estimulando o acúmulo desta proteína para proteger as células através da manutenção da homeostase celular e da conformação correta de proteínas afetadas pela desidratação.

ATP sintase – subunidade β CF1

Essa enzima (spot 41) mostrou maior expressão em plantas não-irrigadas (Tabela 3 e Figura 3). Nos cloroplastos, é responsável pela produção de ATP que serão utilizadas no ciclo de Calvin-Benson durante a fotossíntese (Yamori *et al.*, 2011). Sendo formada por um complexo enzimático envolvido diretamente na

produção de ATP através de ADP e fosfato inorgânico através da utilização do gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, realizando a fosforilação oxidativa (Boyer, 1997). Fatores transcrpcionais são regulados por sinais gerados pelos estresses abióticos como ABA, estado redox, e ainda conteúdo de ATP/NADPH, alterando a expressão de proteínas envolvidas no balanço energético em plantas em resposta às condições de déficit hídrico (Lawlor; Teraza, 2009).

A redução na expressão relativa da ATP sintase, localizada na membrana tilacoideal, já foi relatada por alguns autores, sendo preferencialmente danificadas em relação a outras subunidades (Tezara *et al.*, 1999; Flexas, 2002; Mahler *et al.*, 2007). A redução da síntese de ATP nessas condições é um grande impedimento para fixação de carbono que é realizada pelas enzimas do estroma.

Fosfoglicerato cinase

A fosfoglicerato cinase mostrou dois resultados distintos, onde uma isoforma apresentou redução (spot 46), e outra um aumento (spot 51) em resposta às condições de déficit hídrico (Tabela 3 e Figura 3).

A Fosfoglicerato cinase catalisa a fosforilação do 3-fosfoglicerato, produzindo 1,3-difosfoglicerato e ADP, como parte das reações, regenerando a ribulose-1,5-bisfosfato no ciclo de Calvin-Benson. Um declínio geral em proteínas correspondentes a enzimas fotossintéticas e do metabolismo de carboidratos é normalmente observado em resposta às condições de déficit hídrico, sugerindo uma inibição do metabolismo energético (Castillejo *et al.*, 2008; Nanjo *et al.*, 2010).

Ferrodoxina-NADP redutase 1

Foi evidenciado uma diminuição na expressão relativa desta proteína (spot 47) sob condições de déficit hídrico (Tabela 3 e Figura 3). No genoma de *Arabidopsis* existem quatro genes FNR, sendo duas isoformas encontradas em folhas, que variam em localização subcelular, no entanto, somente uma destas contribui para assimilação de nitrato nas folhas. As outras duas isoformas são encontradas em raízes possuindo papel importante na assimilação de amônio (Hanke *et al.*, 2005).

As Ferredoxinas NADP-redutases (FNRs, EC 1.18.1.2) constituem uma família de enzimas hidrofílicas e monoméricas que contém como grupo prostético por ligação não-covalente uma flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD). Estas enzimas também participam na transferência de elétrons de outros processos metabólicos como a fixação de nitrogênio, biossíntese de isoprenóides, detoxificação xenobiótica, resposta a estresses oxidativos e biogênese de grupamentos ferro-enxofre (Carrillo; Ceccarelli, 2003; Ceccarelli *et al.*, 2004; Medina; Gomez-Moreno, 2004; Seeber *et al.*, 2005). Estas flavoproteínas catalisam a última etapa do transporte de elétrons, ou seja, a transferência de elétrons da ferredoxina, reduzida pelo Fotossistema I, para o NADP⁺, provendo o NADPH necessário para as etapas de assimilação de gás carbônico (Shin; Arnon, 1965). A redução da taxa fotossintética observada, e ainda a redução na taxa de transporte de elétrons podem ser associadas com a redução na expressão desta proteína (Tabela 2 e tabela 3).

Esta enzima desempenha um papel importante como enzima antioxidante envolvida na captura de radicais livres em plantas, e com a manutenção da razão NADPH/NADP⁺ conseguem manter a homeostase em condições de estresses ambientais (Palatnik *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 2007; Valderrama *et al.*, 2006). A maioria dos trabalhos mostrou uma redução na expressão desta enzima sob condições de déficit hídrico (Xiao *et al.*, 2009; Durand *et al.*, 2011), corroborando com o encontrado em nossos resultados.

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

A redução na expressão relativa de uma Gliceraldeído-3-Fosfato desidrogenase A (GAPDH) (spot 48) foi observada em plantas não-irrigadas em relação às plantas irrigadas (Tabela 3 e Figura 3). A GAPDH participa da interconversão de 1,3-bisfosfoglicerato e gliceraldeído 3-fosfato, uma das etapas dependente de NAD(P) tanto na glicólise quanto no ciclo de Calvin-Benson, sendo esta reação um importante centro de integração de sinal entre reações de redução-oxidação. Vários trabalhos na literatura mostram uma redução na expressão desta enzima em relação à estresses (Durand *et al.*, 2011; Sobhanian *et al.*, 2010). As GAPDHs cloroplastídicas podem usar tanto NAD(H) quanto NADP(H), sendo

submetidas a uma complexa regulação por nucleotídeos piridínicos, tioredoxinas e interações proteína-proteína (Sparla *et al.*, 2005).

Algumas funções não-glicolíticas, como regulação da transcrição e apoptose, tem sido atribuídas às enzimas glicolíticas, funções adicionais sugerem uma ligação com sensores metabólicos (Kim; Dnag, 2005; Hara; Snyder, 2006; Colell *et al.*, 2007). Sabe-se ainda que a deficiência de GAPCp afeta a via de biossíntese de ABA, pois o substrato de GAPCp, Gliceraldeído-3-fosfato, é o primeiro precursor da via do metil-eritrol fosfato que é responsável pela biossíntese de ABA nos plastídeos (Munoz-Bertomeu *et al.*, 2011).

Quinona oxidoreductase

Esta enzima (spot 52) apresentou um aumento na expressão quando submetida às condições de déficit hídrico (Tabela 3 e Figura 3). As quinonas oxidoredutases são conhecidas por agir como carreadores móveis de elétrons dentro de uma fase lipídica da membrana das cadeias de transporte de elétrons nas reações da fotossíntese e respiração (Cramer *et al.*, 1991).

Tem sido relatado o aumento na expressão desta proteína em condições de estresses (Nouri; Komatsu, 2010; Castillejo *et al.*, 2008). Provavelmente, o aumento na expressão desta proteína está relacionado com sua função no acoplamento quimio-osmótico, prevenindo a célula de danos causados pela formação de radicais livres (Ban *et al.*, 1992).

Rieske

Esta proteína (spot 63) foi observada somente em plantas submetidas às condições de déficit hídrico (Tabela 3 e Figura 3), não sendo detectada em condições irrigadas. O Complexo do Citocromo b6F é formado de subunidades, dentre elas está a subunidade ferro-enxofre ou subunidade Rieske. É uma das três proteínas integrais de membrana responsável pelo transporte de elétrons e transdução de energia nas membranas fotossintetizantes.

E esta proteína, além de contribuir para a fotoproteção e reparo do fotossistema II durante e após estresses abióticos, também confere tolerância à estresses quando sua expressão é aumentada (Madueno, 1993; Schroda *et al.*, 1999). Sanda e colaboradores (2008) mostraram que a subunidade Rieske tinha sua expressão aumentada em condições de déficit hídrico, porém a quantidade

Tabela 3. Nível de expressão relativa das proteínas de folhas responsivas as condições de déficit hídrico ($\Psi_{pd} = -1,5$ MPa) na variedade UFVTN105AP durante o período reprodutivo (R4-R5).

Spot ⁽¹⁾	Identificação 2D platinum ⁽²⁾	Local	PROTEÍNA	Média % volume $\pm$ DP ⁽³⁾		Nível de expressão
				Irrigado	Não-irrigado	
37	271	folha	HSP 70 KDa - cloroplastica	0.1729 $\pm$ 0.0234	0.2442 $\pm$ 0.0126	1.4123
40	266	folha	Chaperonina 60 (Cnp60)	0.1285 $\pm$ 0.0070	0.1469 $\pm$ 0.0228	1.1375
41	190	folha	ATP sintase - subunidade β CF1	5.0119 $\pm$ 0.2160	3.8156 $\pm$ 0.1629	-1.3135
42	743	folha	Fator de alongação EF-Tu		0.7115 $\pm$ 0.1476	n.a.
43	158	folha	Glutamina sintetase	0.5154 $\pm$ 0.0348		n.a.
46	125	folha	Fosfoglicerato cinase	1.0505 $\pm$ 0.0465	0.7224 $\pm$ 0.0488	-1.4541
47	81	folha	Ferredoxina-NADP redutase 1	0.2744 $\pm$ 0.0021	0.2167 $\pm$ 0.0031	-1.2658
48	155	folha	Gliceraldeído-3-Fosfato desidrogenase A	0.1360 $\pm$ 0.0054	0.0575 $\pm$ 0.0205	-2.3651
51	131	folha	Fosfoglicerato cinase	0.0532 $\pm$ 0.0016	0.0722 $\pm$ 0.0056	1.3565
52	96	folha	Quinona oxidoreductase	0.0607 $\pm$ 0.0071	0.0921 $\pm$ 0.0094	1.5185
53	87	folha	Aldo-ceto redutase 4	0.0167 $\pm$ 0.0019	0.0306 $\pm$ 0.0032	1.8319
54	44	folha	Ascorbato peroxidase 2	0.1887 $\pm$ 0.0091	0.2700 $\pm$ 0.0275	1.4306
55	66	folha	Fibrilina	0.0513 $\pm$ 0.0076	0.1514 $\pm$ 0.0296	2.9510
56	47	folha	Chaperone 20 (Cnp20)	0.0311 $\pm$ 0.0006	0.0599 $\pm$ 0.0080	1.9268
57	91	folha	Ciclina-A1-1	0.0297 $\pm$ 0.0047	0.0442 $\pm$ 0.0008	1.4900
60	158	folha	ASR (abscisic stress ripening-like)		4.2249 $\pm$ 0.6001	n.a.
61	665	folha	Glutathione S-transferase		0.0965 $\pm$ 0.0161	n.a.
63	629	folha	Rieske (Complexo do Citocromo b6f)		0.1583 $\pm$ 0.0063	n.a.
64	652	folha	HSP 18.5 kDa		0.0522 $\pm$ 0.0055	n.a.
65	647	folha	Peroxiredoxina (PRX-5)		0.0788 $\pm$ 0.0056	n.a.
66	648	folha	Peroxiredoxina (PRX-5)		0.0533 $\pm$ 0.0162	n.a.

⁽¹⁾ Os números correspondem aos spots numerados na Figura 2 e 3. ⁽²⁾ Os números correspondem ao número de referencia elencado pelo programa de análise dos géis bidimensionais, software Image Master 2D platinum. ⁽³⁾ Os valores representam as médias da porcentagem em volume (abundância relativa) $\pm$ o desvio padrão de três replicatas biológicas. Condições irrigadas ($\Psi_{pd} \geq -0,05$ MPa) e condições não-irrigadas ($\Psi_{pd} = -1,5$ MPa). As barras azuis significam em números de vezes o quanto a abundância protéica aumentou ou diminuiu na condição não-irrigada em relação à condição tratada. Todos os valores de médias diferem entre si estatisticamente segundo Teste T de Student com nível de significância $p \leq 0,05$.

total da proteína não aumentava. No entanto, através de análises por western blot, este mesmo trabalho mostrou que existiam múltiplos spots para a proteína Rieske muito similares em peso molecular, mas diferentes em ponto isoelétricos, sugerindo que esta proteína estaria sendo modificada em nível pós-traducional nestas condições (Sanda *et al.*, 2008).

Glutamina sintetase

Neste trabalho, esta proteína (spot 43) foi detectada somente em condições irrigadas (Tabela 3 e Figura 3). A Glutamina sintetase é uma enzima chave no metabolismo de nitrogênio, nutriente essencial para o desenvolvimento e produtividade das plantas, catalisando a condensação de amônio e glutamato em glutamina (Cánovas *et al.*, 1998).

A maioria das plantas superiores possui duas isoformas de GS, a GS1 localizada no citosol e a GS2, no cloroplasto (Edwards, 1990). A distribuição órgão-específica determina as funções fisiológicas distintas de GS1 e GS2. A primeira está localizada no tecido vascular e desempenha um importante papel na assimilação de amônio, derivado da fixação de nitrogênio e outras fontes de nitrogênio, e da remobilização de nitrogênio durante a senescência (Teixeira *et al.*, 2005; Tabuchi *et al.*, 2007). A segunda, a GS2 cloroplastídica é responsável pela reassimilação de amônio derivado da fotorespiração, sendo formada por um único gene nuclear (Zozaya-Garza; Sengupta-Gopalan, 1999; Orea *et al.*, 2002), entretanto sua presença em tecidos não-fotossintetizantes já foi reportada (Woodall; Forde, 1996; Melo *et al.*, 2003).

HONGMEI *et al.* (2009) mostraram em plantas superexpressando GS um aumento no conteúdo de aminoácidos totais e nitrogênio em toda a planta aliado a uma maior tolerância à seca. Em algumas plantas a atividade de GS diminui, enquanto em outros esta enzima exibe um aumento na expressão em resposta a estresse hídrico ou estresse salino (Silveira *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2004; Shunping *et al.*, 2005).

Aldo-ceto redutase 4

Em relação a proteína Aldo-ceto redutase (spot 53) foi observado um aumento na expressão quando as plantas foram submetidas às condições de déficit

hídrico (Tabela 3 e Figura 3). As aldo/ceto redutase (AKRs) são proteínas que pertencem a uma superfamília que incluem aldeído redutases e aldoses redutases caracterizadas como oxiredutases citosólicas dependentes de NADPH tendo como função a redução de uma variedade de compostos carbonílicos (Morita *et al.*, 2007). Oberschall e colaboradores (2000) mostraram que plantas transformadas super-expressando aldo/ceto redutases apresentavam uma redução na peroxidação lipídica sob condições de estresses hídricos (Oberschall *et al.*, 2000). *Xerophyta viscosa* apresentou a expressão de uma AKR sob condições de desidratação (Mundree *et al.*, 2000). Experimentos com tabaco sob condições de déficit hídrico mostraram que aldeídos redutases tem função na detoxificação celular (Hideg *et al.*, 2003). O aumento na abundância desta enzima sugere envolvimento na detoxificação de aldeídos tóxicos geradas sob condições de déficit hídrico.

Ascorbato peroxidase 2

Neste trabalho, foi observado um aumento na expressão da proteína ascorbato peroxidase (APX) (spot 54) quando o genótipo UFVTN105AP foi submetido à condição de déficit hídrico (Tabela 3 e Figura 3). A ascorbato peroxidase catalisa a redução de peróxido de hidrogênio à água e tem uma grande especificidade e afinidade pelo ascorbato como redutor, sendo encontradas diferentes formas de APX nos cloroplastos, citosol, mitocôndria e glioxissomos (Shigeoka *et al.*, 2002).

A eliminação de peróxido de hidrogênio do cloroplasto e do citosol resulta em uma tolerância a estresses, sendo já reportado um aumento na expressão desta enzima durante o estresse hídrico (Mittler; Zilinskas, 1994). Alguns grupos de pesquisas observaram que a expressão do gene APX, da proteína APX, ou a atividade da APX pode ser alterado por muitos estresses bióticos e abióticos (Mittler; Zilinskas, 1994; Wang; Jiang, 2007; D'arcy-Lameta *et al.*, 2006). Portanto, o aumento na expressão desta proteína esta relacionada a detoxificação celular.

Glutathione S-transferase

A Glutathione S-transferase (GST; spot 61) foi evidenciada somente nas plantas submetidas às condições de déficit hídrico (Tabela 3 e Figura 3). A enzima

Glutathione S-transferase está envolvida no controle da concentração de espécies reativas de oxigênio (EROS) (May *et al.*, 1998; Foyer; Noctor, 2005). Sabe-se que a formação de EROS é potencializada pelas condições de estresses abióticos. As GSTs participam na detoxificação interagindo com os EROS (Mittler *et al.*, 2004; Pitzschke, 2006). Vários trabalhos mostraram que o déficit hídrico induz a expressão de GSTs, (Jiang *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2004; Anderson; Davis, 2004; Ji *et al.*, 2010; Kellos *et al.*, 2008; Xu; Huang, 2008; Haluskova *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013). O aumento na expressão desta proteína está relacionada a detoxificação celular.

Peroxiredoxina (PRX-5)

As duas isoformas desta proteína (spot 65 e 66) encontradas neste trabalho mostraram expressão somente em condições não-irrigadas (Tabela 3 e Figura 3). As peroxiredoxinas pertencem à classe peroxidases, grupo não-heme, subgrupo Thiol-peroxidases (Oliva *et al.*, 2009). As peroxidases (EC 1.11.1.x) são enzimas capazes de executar a reação na qual um peróxido é reduzido e um substrato é oxidado, tendo um papel fundamental no sistema antioxidativo (Fourquet *et al.*, 2008; Stone; Yang, 2006; Veal *et al.*, 2007; Winterbourn, 2008). As peroxiredoxinas são enzimas que participam na proliferação celular, diferenciação, apoptose e fotossíntese (Caporaletti *et al.*, 2007). Foi demonstrado que as Prxs também podem atuar como chaperonas ou como reguladores do ciclo celular (Phalen *et al.*, 2006; Trotter *et al.*, 2008; König *et al.*, 2013).

O aumento na expressão desta proteína foi observado em inúmeros trabalhos sob condições de déficit hídrico (Ali; Komatsu, 2006; Ko Nig *et al.*, 2002; Hajheidari *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2012; Hajheidari *et al.*, 2007). Portanto, o aumento na expressão desta proteína está relacionada a algumas das funções discutidas acima.

Fator de alongação EF-Tu

Foi observado que a proteína EF-Tu (spot 42), um fator de alongação, teve sua expressão detectada somente em plantas submetidas às condições de déficit hídrico (Tabela 3 e Figura 3). Komatsu e colaboradores através de análises

proteômicas mostraram que o fator de alongação EF-Tu tinha sua expressão aumentada em estresse hídrico em soja (Komatsu *et al.*, 2011). Em estresses como o déficit hídrico os processos de regulação desencadeiam um ajustamento do metabolismo para a nova condição, e isto envolve mudanças na expressão gênica. Trabalhos mostram que várias proteínas associadas com a síntese de proteínas aumentam em condições de déficit hídrico, incluindo os fatores de alongação da tradução (Ndimba *et al.*, 2005; Yoshimura *et al.*, 2008).

Fibrilina

A proteína Fibrilina (spot 55), também chamada de PAP (*Plastid lipid-associated protein*), teve sua expressão aumentada em condições de déficit hídrico (Tabela 3 e Figura 3). Alguns trabalhos mostram que esta proteína é encontrada em plantas em estruturas chamadas plastoglobulos dentro de cloroplastos (Austin *et al.*, 2006; Vidi *et al.*, 2006; Ytterberg *et al.*, 2006). Trabalhos mais recentes, indicam que os plastoglobulos podem funcionar como uma plataforma especializada para síntese de precursores de ácido jasmônico, estocando triacilglicerol suficiente para realizar a síntese rapidamente após estresse oxidativo iniciar efeitos sobre a maquinaria fotossintética (Youssef *et al.*, 2010). Assim como em nossos resultados, outros autores mostraram também que esta proteína exibe um acúmulo em condições de estresse (Chen *et al.*, 1998; Gillet *et al.*, 1998; Leitner-Dagan *et al.*, 2006; Durand *et al.*, 2011)

Ciclina-A1-1

A proteína Ciclina-A1 isoforma 1 (spot 57) aumentou a expressão nas plantas submetidas ao déficit hídrico (Tabela 3 e Figura 3). Estas proteínas são fundamentais na regulação das proteínas CDK (cyclin-dependent kinase), e além de estarem envolvidas no controle do ciclo celular, também estão envolvidas na regulação da transcrição e disponibilidade por fosfato (Fisher, 2005; Lenburg; O'shea, 1996). Zhou e colaboradores mostraram através da técnica de RNA de interferência que a redução na função de ciclinas em *Arabidopsis thaliana* exibia um fenótipo tolerante à seca, e ainda que sua expressão é reduzida frente à desidratação (Zhou *et al.*, 2013), diferente dos nossos resultados.

Absciscic acid stress ripening protein

A proteína *abscisic acid stress ripening protein* (ASR) (spot 60) foi detectada somente em condições de déficit hídrico (Tabela 3 e Figura 3). Alguns autores sugerem que a proteína ASR está envolvida na expressão de genes do metabolismo de açúcares e na via de sinalização do ABA (Cakir *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005; Frankel *et al.*, 2007). Goldgur e colaboradores (2007), trabalhando com plantas transgênicas que tinha a super-expressão da proteína ASR1, mostraram que em tomates a tolerância ao estresse salino aumentava nestas plantas modificadas em relação às não-modificadas geneticamente (Goldgur *et al.*, 2007). Pérez-Díaz e colaboradores mostraram, em trabalhos com arroz, que os genes OsASR podem ter uma função particular em tecidos específicos com a atividade de fonte (fonte-dreno), muito provavelmente para o transporte de açúcares (Pérez-Díaz *et al.*, 2013).

Tabela 4. Identificação por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF-TOF (AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 System) das proteínas diferencialmente expressas em folhas do genótipo UFVTN105AP submetida às condições de déficit hídrico no período reprodutivo (R4-R5).

Spot	Orgão	Proteína identificada ^(a)	GI ^(b)	Espécie	P/MW		Cobertura ^(e) (%)	Peptídeos identificados
					teórico ^(c)	experimental ^(d)		
37	folha	HSP 70 KDa - cloroplastídica	356559803	Glycine max	5.2/73755	4.58/82702	0.0189	DLDEVILVGGSTR
40	folha	Chaperonina 60 (Cnp60) cloroplastídica	356556926	Glycine max	5.7/62845	5.20/67296	0.022	GYISPYFVTDSEK
41	folha	ATP sintase - subunidadeβ CF1	83595727	Glycine max	5.3/53755	5.33/57578	0.305	AHGGVSFVGGVGER DTVGQINVTCEVQQLGNRR FVQAGSEVSALLGR GMEVIDTGAALSPVGGATLGR IAQIIGPVLDAFPPGK IFNLGEPIDNLGPVDTR IGLFGGAGVGK LAIFETGIK SAPAFIQLDTK VALVYGQNEPPGAR
42	folha	Fator de elongação EF-Tu	18776	Glycine max	6.2/52096	5.34/47274	0.152	GITINTATVEYETENR ILDEALAGDNVGLLLR KYDEIDAAPEER QDQVDDDELLQLVEIEVR VGETVDLVGLR
43	folha	Glutamina sintetase	356555606	Glycine max	6.7/47692	5.41/45429	0.16	HETASINTFSWGVANR IIAEYIWIWGTGIDVR LEGLNLDTPTFDK VQAEVPWYGIQEYTLQTNVK
46	folha	Fosfoglicerato cinase cloroplastídica	356557028	Glycine max	7.8/50067	5.40/44022	0.311	ADLNVPDDNQITDDTR AQGLSVGSSLVEEDKDLATSLAK ELDYLVGAVSSPK GVSLLLPSDVVIADK LASLADLFVNDAFGTAHR LVASLPDGGVLLLENVR VVPASAPDGMGLDGPDSVK YLKPSVAGFLLQK YSLAPLVPR
47	folha	Ferredoxina-NADP redutase 1 cloroplastídica	356559282	Glycine max	8.0/40571	5.81/35665	0.0967	DPNATIIMLTGTGTGIAPFR LYSIASSAIGDFGDSK
48	folha	Gliceraldeído-3-Fosfato desidrogenase A cloroplastídica	356561064	Glycine max	7.6/43203	6.50/44754	0.285	DLGIDLVIETGTVFVDR DSPLDVIAINDTGGVK ESADNELQGLSVCEPLVSVDFR NPANLPWK TFAEVNAEFR VIAWYDNEWGYSQR YDSILGTFDADV KPVGSDIISVDGK
51	folha	Fosfoglicerato cinase citossólica	356557030	Glycine max	6.0/42435	5.96/42987	0.304	ELDYLVGAVSNPK GVSLLLPTDVVIADK GVTTIIGGDSVAVEK LASLADLYVNDAFGTAHR LVTQLPEGGVLLLENVR RPFANVGGSK VDLNVPDDNLNITDDTR YLKPSVAGFLMQK
52	folha	Quinona oxidoreductase	363808268	Glycine max	6.7/34510	6.30/38445	0.345	AWTYSEYVK FDVVYDVTGQTEQAFK FNQSVLPEVK LNPYFESGK NLGADWPIDYTK SILVLGGAGGVGTHVIQLAK SPFPFSQTVEFAHLETNR VIGSLAEYTAEEER
53	folha	Aldo-ceto redutase 4	356504240	Glycine max	6.0/35209	6.22/37131	0.0274	FFELNTGAK

Spot	Órgão	Proteína identificada ^(a)	GI ^(b)	Espécie	P/MW		Cobertura ^(E) (%)	Peptídeos identificados
					teórico ^(c)	experimental ^(d)		
54	folha	Ascorbato peroxidase 2	351726325	Glycine max	5.6/27126	5.62/29649	0.216	EDKPEPPPEGR HPSELAHGANNGLDIAVR LAWHSAGTYDVSSK SYPTVSADYQK
55	folha	Fibrilina cloroplastídica	356555702	Glycine max	5.7/33295	4.41/33299	0.108	GDGGSVFVLIK IPISNSNAQSWLLTTYLDEELR
56	folha	Chaperone 20 (Cnp20) cloroplastídica	356556406	Glycine max	7.8/26670	5.13/30165	0.134	DKPSIGTVIAVGPGLDEEGNR YAGTEVDFDGTK
57	folha	Ciclina-A1-1	363807920	Glycine max	8.4/56112	5.84/37644	0.0338	NAPYSSSSSLVQGSNK
60	folha	ASR (abscisic stress ripening-like)	351722069	Glycine max	5.6/25354	5.84/37645	0.197	HKIEEEVAAAAVSGGGFAFHEHHEK HLEHLGELGAASAAAYALHEK IEEEVAAAAVSGGGFAFHEHHEK
61	folha	Glutathione S-transferase	351727897	Glycine max	5.2/25150	5.44/28026	0.0935	APILPSPDYER FWVDYIDK FWVDYIDKK
63	folha	Rieske (Complexo do Citocromo b6f) cloroplastídica	356549980	Glycine max	8.7/24177	6.04/20278	0.238	DAVGNVDIAENWLK GDPTLVVEK GPAPLSLALAHCDIDDK VVFVPWVETDFR
64	folha	HSP 18.5 kDa	351721881	Glycine max	5.8/18503	5.67/20332	0.112	DFPFPNTLSSASFPEFSR
65	folha	Peroxiredoxina (PRX-5)	351724985	Glycine max	5.4/17366	5.81/18381	0.42	FALLVEDLK HVPGFIER VANVESGGFTISSAEEIK VIIFGVPGAFTPTCSLK YTNALGLELDLTDK
66	folha	Peroxiredoxina (PRX-5)	351724985	Glycine max	5.4/17366	5.48/18582	0.42	FALLVEDLK HVPGFIER VANVESGGFTISSAEEIK VIIFGVPGAFTPTCSLK YTNALGLELDLTDK

(a) identificação putative através do MASCOT MS/MS Ion search;

(b) GenInfo Identifier (GI) – número de acesso no National Center for Biotechnology Information (NCBI)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

(c) ponto isoelétrico e massa teórica determinada no Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>)

(d) ponto isoelétrico e massa experimental determinada pelo Image master 2D Platinum ;

(e) porcentagem de cobertura obtida no software Scaffold (Proteome Software, Inc., Portugal, OR).

Análise da expressão gênica relativa em folhas por PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)

A análise da expressão gênica relativa em folhas por PCR quantitativo em tempo real foi realizada para investigar mudanças na expressão gênica em nível de mRNA em condições de déficit hídrico (Figura 4). Foram analisados genes em folhas do genótipo UFVTN105AP em que a abundância de transcritos medida pelo PCR quantitativo em tempo real foi similar na maioria dos casos à abundância relativa observada nas análises proteômicas para folhas (Tabela 3).

Em um total de quinze sequências de proteínas analisadas, oito genes mostraram o mesmo comportamento na expressão encontrado em análises proteômicas. Porém, outras três mostraram resultados divergentes das análises proteômicas (Figura 3, Tabela 3).

Os resultados desta análise confirmam que o nível de mRNA nem sempre pode ser correlacionado com o nível de proteínas (Tian *et al.*, 2004; Mackay *et al.*, 2004; Gygi *et al.*, 1999). Mesmo quando mudanças no nível de transcritos não levam à mudanças no nível de proteínas, esta aparente discrepância pode ser explicada pelas análises quantitativas, e ainda fornecer informações sobre a regulação transcricional, traducional e redes de sinalização que controlam a abundância de transcritos e proteínas sob uma determinada condição (Fernie; Stitt, 2012).

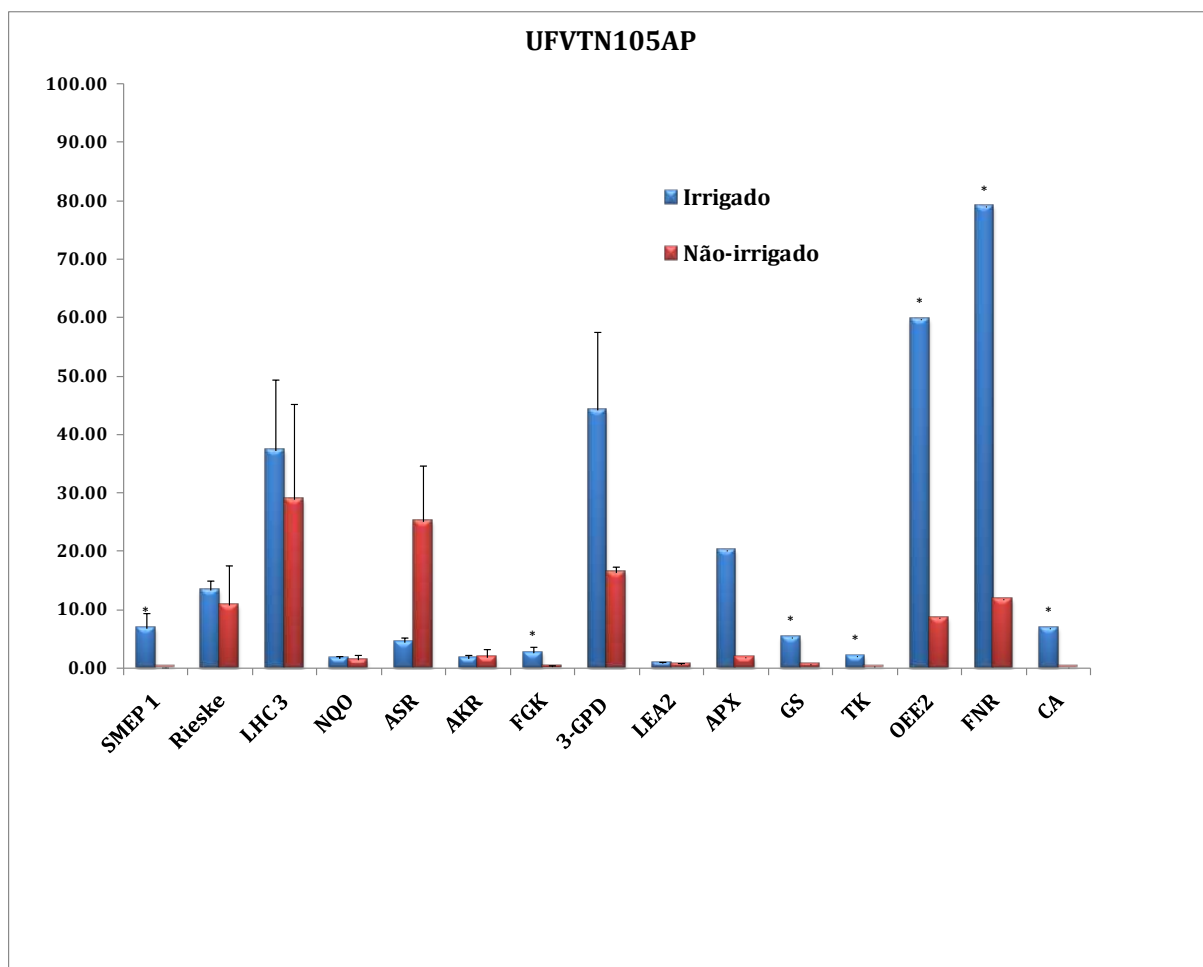


Figura 4. Análise da expressão gênica relativa por PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR) em folhas do genótipo UFVTN105AP submetidas às condições de déficit hídrico no estágio reprodutivo (R4-R5). *Estatisticamente significativas segundo t-test de Student's ($p < 0.05$). SMEP1 (metaloendoproteínase); Rieske (Complexo do Citocromo b6f); LHC3 (proteína do sistema de coleta de Luz do Fotossistema); NQO1 (Quinona oxidoreductase); ASR (abscisic stress ripening protein); AKR (Aldo-ceto redutase); FGK (Fosfoglicerato cinase); 3-GPD (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase); LEA2 (Deidrina); APX (Ascorbato peroxidase); GS (Glutamina sintetase); TK (Transcetolase); OEE2 (Complexo de evolução do oxigênio 2); FNR (Ferrodoxina NADP redutase); CA (Anidrase carbônica).

Análise do conteúdo de óleo e proteína por espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR)

Através da análise do conteúdo de óleo e proteína por espectroscopia de infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) foi observado uma redução no conteúdo de óleo nas sementes submetidas às condições de déficit hídrico, entretanto o conteúdo de proteínas não mostrou alteração segundo nossas análises (Figura 5).

O alto nível de carbonos reduzidos nos ácidos graxos explica porque a oxidação de óleos necessita de mais energia do que a oxidação de carboidratos ou proteínas. Portanto, a síntese de ácidos graxos tem uma alta demanda pelo ATP do estroma e seus redutores equivalentes, sendo assim afetada em maior extensão pelas condições de déficit hídrico como foi observado em nossos resultados através da redução na expressão da ATP sintase cloroplastídica e mitocondrial (Figura 3). O fato, por exemplo, da glutamina sintetase não ter sido detectada sob condições de estresse hídrico pode ser relacionada com a manutenção no conteúdo de proteínas nas sementes (Figura 5), uma vez que aquela proteína está relacionada com a reassimilação de nitrogênio.

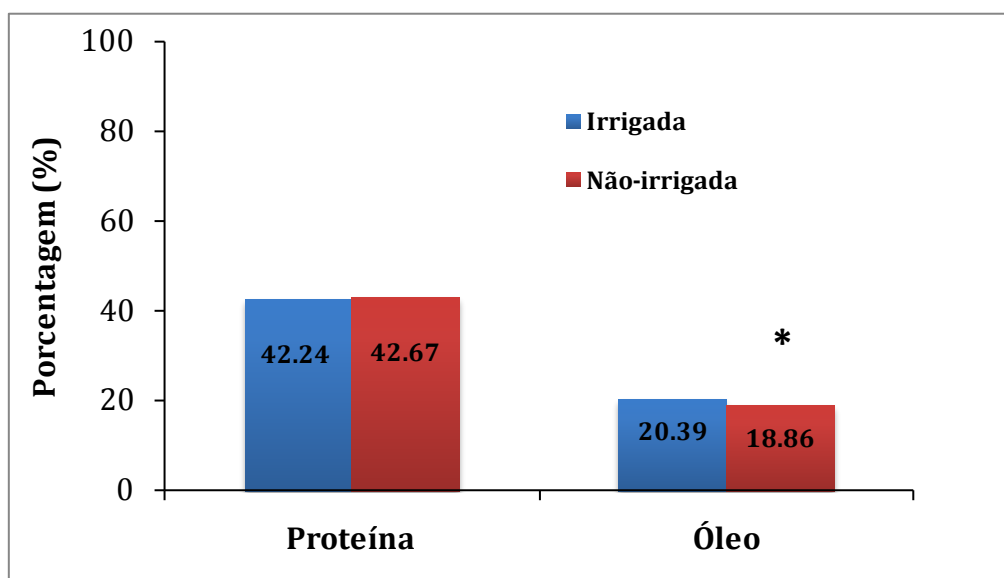


Figura 5. Análise do conteúdo de óleo e proteína por *espectroscopia de infravermelho próximo* com transformada de *Fourier* (FT-NIR) em sementes maduras (R8) do genótipo UFVTN105AP submetida às condições de déficit hídrico. Estatisticamente significativas segundo t-test de Student's. ($p < 0.05$).

CONCLUSÕES

A partir das análises fisiológicas ficou bem caracterizada a ocorrência das condições de déficit hídrico nestas plantas, sendo verificada através da redução da taxa de assimilação de carbono, da condutância estomática, da taxa transpiratória, e da concentração interna/externa de dióxido de carbono.

Os resultados de proteômica e qPCR mostraram a ocorrência de uma expressão gênica diferencial em proteínas envolvidas no processamento protéico, metabolismo de carbono, defesa e estresse oxidativo, além de outras relacionadas a funções específicas.

Neste trabalho, as condições de déficit hídrico aplicadas durante o estágio reprodutivo reduziram o conteúdo de óleo nas sementes maduras no genótipo UFVTN105AP.

A remobilização de carbono e nitrogênio de tecidos vegetativos para sementes em desenvolvimento é uma importante alternativa de fonte de carbono e nitrogênio durante o enchimento do grão. Com o estresse hídrico a diminuição da taxa fotossintética afeta a quantidade de assimilados disponíveis para exportação para os órgãos dreno, e sendo o acúmulo de óleo nas sementes dependente do metabolismo de carbono. Portanto, a redução de várias enzimas envolvidas no metabolismo de carbono, como enzimas da glicólise e ciclo de Calvin-Benson, observadas em resposta ao déficit hídrico em folhas estão relacionadas com a redução no conteúdo de óleo nas sementes.

Para este genótipo alterações no metabolismo de nitrogênio ainda não estão ocorrendo para esta intensidade e duração de estresse aplicado, explicando a manutenção do acúmulo de proteínas nas sementes mesmo quando as plantas foram submetidas às condições de déficit hídrico. E ainda, aliado ao fato de que as sementes deste genótipo possuem alto conteúdo proteico, provavelmente isto pode estar relacionado com a manutenção das quantidades de proteína nestas sementes quando em condições de déficit hídrico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. Washington, DC. 1992.

ALI, G. M.; KOMATSU, S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 396–403, 2006.

ALI, G. M.; KOMATSU, S. Proteomic Analysis of Rice Leaf Sheath during Drought Stress. **Journal of Proteome Research**, v. 5, p. 396-403, 2006.

ANDERSON, J. V.; DAVIS, D. G. Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. **Physiologia Plantarum**, v. 120, p. 421–433, 2004.

AUSTIN, J. R. et al. Plastoglobules Are Lipoprotein Subcompartments of the Chloroplast That Are Permanently Coupled to Thylakoid Membranes and Contain Biosynthetic Enzymes. **Plant Cell**, v. 18, p. 1693–1703, 2006.

BALL, M. et al. Applications of chlorophyll fluorescence to forest ecology. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 22, p. 311-319, 1994.

BAN, R. et al. Destruction of vitamin K1 of cultured cells by ultraviolet radiation and its effect on plasma membrane electron transport reactions. **International Journal of Biochemistry**, v.27, p.449-456, 1992.

BONK, M. Purification and characterization of chaperonin 60 and heat-shock protein 70 from chromoplasts of *Narcissus pseudonarcissus*. **Plant Physiology**, v. 111, p. 931–939, 1996.

BOYER, P. D. The ATP synthase: a splendid molecular machine. **Annual Review of Biochemistry**, v. 66, p. 717-749, 1997.

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

BROWN E. A. et al. Response of selected soybean cultivars to soil-moisture deficit. **Agronomy Journal**, v. 77, p. 274–278, 1985.

CAKIR, B. et al. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. **Plant Cell**, v. 15, p. 2165–2180, 2003.

CÁNOVAS, F. M. et al. Molecular physiology of glutamine and glutamate biosynthesis in developing seedlings of conifers. **Physiologia Plantarum**, v. 103, p. 287-294, 1998.

CAPORALETTI, D. et al. Non-reductive modulation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by 2-Cys peroxiredoxin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, p. 722–727, 2007.

CARRILLO, N.; CECCARELLI, E. A. Open questions in ferredoxin-NADP⁺ reductase catalytic mechanism. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 1900-1915, 2003.

CASTILLEJO, M. A. et al. Proteomic Analysis of Responses to Drought Stress in Sunflower (*Helianthus annuus*) Leaves by 2DE Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. **The Open Proteomics Journal**, v. 1, p. 59-71, 2008.

CASTILLEJO, M. Á. et al. Proteomic Analysis of Responses to Drought Stress in Sunflower (*Helianthus annuus*) Leaves by 2DE Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. **The Open Proteomics Journal**, v. 1, p. 59-71, 2008.

CECCARELLI, E. A. et al. Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases. **Biochimistry and Biophysica Acta**, v. 1698, p. 155-165, 2004.

CHEN, G. G.; JAGENDORF, A. T. Chloroplast molecular chaperone- assisted refolding and reconstitution of an active multisubunit coupling factor CF1 core. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 11497–11501, 1994.

CHEN, H. C. et al. Drought and wound-induced expression in leaves of a gene encoding a chloroplast carotenoid-associated protein. **Plant Journal**, v. 14, p. 317–326, 1998.

CHEN, K. M. et al. Gradual drought under field conditions influences the glutathione metabolism, redox balance and energy supply in spring wheat. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 23, p. 20-28, 2004.

CHO, C.-W. et al. Molecular characterization of a 2-Cys peroxiredoxin induced by abiotic stress in mungbean. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 108, p. 473–484, 2012.

CLEMENT, M. et al. The cytosolic/nuclear HSC70 and HSC90 molecular chaperones are important for stomatal closure and modulate abscisic acid dependent physiological responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 156, p. 1481-1492, 2011.

COLELL, A.; RICCI, J. E.; TAIT, S. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. **Cell**, v. 129, p. 983–997, 2007.

CRAMER, W. A. et al. Electron transport between photosystem II and photosystem I. **Current Topics in Bioenergetics**, v. 16, p. 179-222, 1991.

D'ARCY-LAMETA, A. et al. Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in cowpea leaves. **Annals of Botany**, v. 97, p. 133-140, 2006.

DURAND, T. C. et al. Poplar under drought: comparison of leaf and cambial proteomic responses. **Journal of Proteomics**, v. 74, p. 1396-1410, 2011.

EDWARDS, J. et al. Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 3459-3463, 1990.

ELLIS, R. J. Molecular chaperones: the plant connection. *Science*, v. 250, p. 954–959, 1990.

FISHER, R. P. Secrets of Double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 5171-5180, 2005.

FERNIE, A. R.; STITT, M. On the Discordance of Metabolomics with Proteomics and Transcriptomics: Coping with Increasing Complexity in Logic, Chemistry, and Network Interactions. *Plant Physiology*, 158, p. 1139–1145, 2012.

FLEXAS J, M. H. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. **Annual Botany**, v. 89, p. 183-189, 2002.

FOURQUET, S. et al. The dual functions of thiol-based peroxidases in H₂O₂ scavenging and signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, p. 1565–1576, 2008.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic link between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, v. 17, p. 1866-1875, 2005.

FRANCO, A. C.; LUTTGE, U. Midday depression in savanna trees: coordinates adjustments in photochemical efficiency, photorespiration, CO₂ assimilation and water use efficiency. **Oecologia**, v. 131, p. 356-365, 2002.

FRANKEL, N. et al. ci21A/Asr1 expression influences glucose accumulation in potato tubers. **Plant Molecular Biology**, v. 63, p. 719–730, 2007.

GILLET, B. et al. Molecular characterization of CDSP 34, a chloroplastic protein induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants, and regulation of CDSP 34 expression by ABA and high illumination. **Plant Journal**, v. 16, p. 257-262, 1998.

GOLDGUR, Y. et al. Desiccation and Zinc Binding Induce Transition of Tomato Absciscic Acid Stress Ripening. *Plant Physiology*, v. 143, p. 617-628, 2007.

GRUBER, A. V. et al. The complexity of chloroplast chaperonins. **Trends in Plant Science**, p. IN PRESS, 2013.

GYGI, S. P. et al. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 1720–1730, 1999.

HAJHEIDARI, M. et al. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. **Proteomics**, v. 5, p. 950–960, 2005.

HAJHEIDARI, M. et al. Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. **Journal of Proteome Research**, v. 6, p. 1451-1460, 2007.

HALUSKOVA, L. et al. Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 1069–1074, 2009.

HANANIA, U. Silencing of chaperonin 21, that was differentially expressed in inflorescence of seedless and seeded grapes, promoted seed abortion in tobacco and tomato fruits. **Transgenic Research**, v. 16, p. 515–525, 2007.

HANKE, G. T. et al. Multiple iso-proteins of FNR in Arabidopsis : evidence for different contributions to chloroplast function and nitrogen assimilation. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, p. 1146–1157, 2005.

HARA, M. R.; SNYDER, S. H. Nitric oxide–GAPDH–Siah: a novel cell death cascade. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, p. 527–538, 2006.

HIDEG, E. et al. Detoxification function of aldose/aldehyde reductase during drought and ultraviolet-B (280-230nm) stresses. **Plant Cell and Environment**, v. 26, p. 513-522, 2003.

ISHIKAWA, A. Deletion of a chaperonin 60 beta gene leads to cell death in the Arabidopsis lesion initiation 1 mutant. **Plant Cell Physiology**, v. 44, p. 255–261, 2003.

Ji, W. et al. Over-expression of a glutathione S-transferase gene, GsGST, from wild soybean (Glycine soja) enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1173–1179, 2010.

Ji, W. et al. Over-expression of a glutathione S-transferase gene, GsGST, from wild soybean (Glycine soja) enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1173–1179, 2010.

JIANG, Y. et al. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in Arabidopsis roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 3591–3607, 2007.

KASCHUK, G. et al. Differences in photosynthetic behaviour and leaf senescence of soybean (Glycine max [L.] Merrill) dependent on N₂ fixation or nitrate supply. **Plant Biology**, v. 12, p. 60-69, 2010.

KELLOS, T. et al. Stress hormones and abiotic stresses have different effects on antioxidants in maize lines with different sensitivity. **Plant Biology**, v. 10, p. 563–572, 2008.

KIM, J. W.; DANG, C. V. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, p. 142–150, 2005.

KO NIG, J. et al. The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 5738-5743, 2002.

KOMATSU, S. et al. Comprehensive Analysis of Mitochondria in Roots and Hypocotyls of Soybean under Flooding Stress using Proteomics and Metabolomics Techniques. **Journal Proteome Research**, v. 10, p. 3993-4004, 2011.

KÖNIG, J. et al. The conformational bases for the two functionalities of 2-cysteine peroxiredoxins as peroxidase and chaperone. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 3483–3497, 2013.

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

LAWLOR, D. W.; TERAZA, W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. **Annals of Botany**, v. 103, p. 561–579, 2009.

- LEITNER-DAGAN, Y. et al. Expression and functional Analyses of the Plastid Lipid-Associated Protein CHRC Suggest Its Role in Chromoplastogenesis and Stress. **Plant Physiology**, v. 142, p. 233-244, 2006.
- LENBURG, M. E.; O'SHEA, E. K. Signaling phosphate starvation. **Trends in Biochemistry Science**, v. 21, p. 384-387, 1996.
- LIU, J. et al. Salt stress responses in Arabidopsis utilize a signal transduction pathway related to endoplasmatic reticulum stress signaling. **The Plant Journal**, v. 51, p. 897-909, 2007.
- LIU, T. et al. Identification of proteins regulated by ABA in response to combined drought and heat stress in maize roots. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 501-513, 2013.
- LISAR, S. Y. S., ET AL. "Water stress in plants: causes, effects and responses." Water stress. InTech Publishers (2012): 1-15.
- LIVAK, K. J. Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LUBBEN, T. H. Several proteins imported into chloroplasts form stable complexes with the GroEL-related chloroplast molecular chaperone. **Plant Cell**, v. 1, p. 1223-1230, 1989.
- LUTZ, I. A. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: [s.n.], v. 1, 1985. 533 p.
- MACKAY, V. L. et al. Gene expression analyzed by high-resolution state array analysis and quantitative proteomics. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 3, p. 478-489, 2004.
- MADUENO, F. et al. Newly imported rieske iron-sulfur protein associates with both Cpn60 and Hsp70 in the chloroplast stroma. **Plant Cell**, v. 5, p. 1865-1876, 1993.
- MAHLER, H. et al. Singlet oxygen affects the activity of the thylakoid ATP synthase and has a strong impact on its g subunit. **Planta**, v. 225, p. 1073-1083, 2007.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 659-68, 2000.
- MAY, M. J. et al. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 649-667, 1998.
- MEDINA, M.; GOMEZ-MORENO, C. Interaction of Ferredoxin-NADP+ Reductase with Its Substrates: Optimal Interaction for Efficient Electron Transfer. **Photosynthesis Research**, v. 79, p. 113-131, 2004.
- MELO, P. M. et al. Expression of the plastid-located glutamine synthetase of *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, v. 132, p. 390-399, 2003.
- MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 490-498, 2004.

- MITTLER, R.; ZILINSKAS, B. A. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. **Plant Journal**, v. 5, p. 397–405, 1994.
- MORITA, H. et al. Cloning and functional analysis of a novel Aldo-keto reductase from *Aloe arborescens*. **Biological Pharmacology Bulletin**, v. 30, p. 2262-2267, 2007.
- MUNDREE, S. G. et al. An aldose reductase homolog from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. **Planta**, v. 211, p. 693-700, 2000.
- MUNOZ-BERTOMEU, J. et al. Arabidopsis plants deficient in plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase show alterations in abscisic acid (ABA) signal transduction: interaction between ABA and primary metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1229–1239, 2011.
- NANJO, Y. et al. Comparative Proteomic Analysis of Early-Stage Soybean Seedlings Responses to Flooding by Using Gel and Gel-Free Techniques. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 3989–4002, 2010.
- NDIMBA, B. K. et al. Identification of Arabidopsis salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, v. 5, p. 4185-4196, 2005.
- NOURI, M.-Z.; KOMATSU, S. Comparative analysis of soybean plasma membrane proteins under osmotic stress using gel-based and LC MS/MS-based proteomics approaches. **Proteomics**, v. 10, p. 1930–1945, 2010.
- OBERSCHALL, A. et al. A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. **Plant Journal**, v. 24, p. 437-446, 2000.
- OLIVA, M. et al. PeroxiBase: a powerful tool to collect and analyse peroxidase sequences from Viridiplantae. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 453–459, 2009.
- OREA, A. et al. Isolation of photorespiratory mutants from *Lotus japonicus* deficient in glutamine synthetase. **Physiologia plantarum**, v. 115, p. 352–361, 2002.
- PALATNIK, J. F.; VALLE, E. M.; CARRILLO, N. Oxidative stress causes ferredoxin NADP(+) reductase solubilization from the thylakoid membranes in methyl viologen treated plants. **Plant Physiology**, v. 115, p. 1721–1727, 1997.
- PENG, L. A chaperonin subunit with unique structures is essential for folding of a specific substrate. **PLoS One Biology**, v. 9, p. e1001040, 2011.
- PÉREZ-DÍAZ, J. et al. Organ- and stress-specific expression of the ASR genes in rice. **Plant Cell Reports**, v. 32, p. print on line, 2013.
- PHALEN, T. J. et al. Oxidation state governs structural transitions in peroxiredoxin II that correlate with cell cycle arrest and recovery. **The Journal of Cell Biology**, v. 175, p. 779–78, 2006.

- PITZSCHKE, A. et al. Reactive oxygen species signalling in plants. **Antioxidant & Redox Signal**, v. 8, p. 1757–1764, 2006.
- RODRIGUEZ, R. E. et al. Transgenic tobacco plants overexpressing chloroplastic ferredoxin-NADP(H) reductase display normal rates of photosynthesis and increase tolerance to oxidative stress. **Plant Physiology**, v. 143, p. 639-649, 2007.
- ROTUNDO JL, W. M. (. Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition. **Field Crops research**, v. 110, p. 147–156, 2009.
- SANDA, S. et al. Excess Light-Induced Molecular Responses of Chloroplast Rieske FeS Protein. **Photosynthesis**, p. 941-944, 2008.
- SANTOS, C. et al. Regulation of glutamine synthetase expression in sunflower cells exposed to salt and osmotic stress. **Scientia Horticulturae**, v. 103, p. 101–111, 2004.
- SATO, Y.; YOKOYA, S. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 329-334, 2008.
- SCHRODA, M. et al. A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition.. **Plant Cell**, v. 11, p. 11165–11178, 1999.
- SCHREIBER U, BILGER W, NEUBAUER C (1994) Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator of rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze E-D M, Caldwell MM (eds) Ecophysiology of Photosynthesis. Springer-Verlag, Berlin pp 49–70
- SEEBER, F. et al. The plant-type ferredoxin-NADP⁺ reductase/ferredoxin redox system as a possible drug target against apicomplexan human parasites. *Current Pharmaceutical Design*, v. 11, p. 3159-3172, 2005.
- SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature**, v. 1(6), p. 2856-2860, 2006.
- SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1305-1319, 2002.
- SHIN, M.; ARNON, D. I. Enzymatic mechanisms of pyridine nucleotide reduction in chloroplast. **Journal of Biology Chemistry**, v. 240, p. 1405-1411, 1965.
- SHUNPING, Y. et al. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. **Proteomics**, v. 5, p. 235–244, 2005.
- SILVEIRA, J. A. G. et al. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Jounal of Plant Physiology**, v. 160, p. 115-123, 2003.
- SOBHANIAN, H. et al. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. **Proteome Science**, 8:19, v. 8, p. 19-24, 2010.

SPARLA, F. et al. Regulation of photosynthetic GAPDH dissected by mutants. **Plant Physiology**, v. 138, p. 2210–2219, 2005. ISSN Wedel N., Scheibe R., Pupillo P. & Trost P.

STOLF-MOREIRA, R. et al. Identification of reference genes for expression analysis by real time quantitative PCR in drought-stressed soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, p. 58-65, janeiro 2011. ISSN 1.

STONE, J. R.; YANG, S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. **Antioxidant & Redox Signal**, v. 8, p. 243–270, 2006.

SU, P.; LI, H. Arabidopsis stromal 70-kD heat shock proteins are essential for plant development and important for thermotolerance of germinating seeds. **Plant Physiology**, v. 146, p. 1231-1241, 2008.

SUNG, D.; GUY, C. Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 132, p. 979-987, 2003.

TABUCHI, M. et al. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 2319-2327, 2007.

TAYLOR H. M. et al. Limitations to efficient water use in crop production. **American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of Agronomy**, 1983. 289-317.

TEIXEIRA, J. et al. Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. desiree) plants: Cell- and organ-specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 663-671, 2005.

TEZARA, W. et al. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. **Nature**, v. 401, p. 914-917, 1999.

TIAN, Q. et al. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, p. 960-969, 2004.

TROTTER, E. W. et al. The yeast Tsa1 peroxiredoxin is a ribosome-associated antioxidant. **Biochemical Journal**, v. 412, p. 73–80, 2008.

VALDERRAMA, R. et al. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. **Plant Cell Environmental**, v. 29, p. 1449-1459, 2006.

VEAL, E. A. et al. Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Molecular Cell**, v. 26, p. 1–14, 2007.

VIDI, P. A. et al. Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin e accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. **Journal of Biology Chemistry**, v. 281, p. 11225-11234, 2006.

- WANG W. et al. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v. 24(14), p. 2369-2375, 2003.
- WANG W. et al. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p. 1-14, 2003.
- WANG, K.; JIANG, Y. Antioxidant responses of creeping bent-grass roots to water-logging. **Crop Science**, v. 47, p. 232-238, 2007.
- WATERS, E. The Molecular Evolution of the Small Heat-Shock Proteins in Plants. **Genetics**, v. 141, p. 785-795, 1995.
- WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, p. 278-286, 2008.
- WOODALL, J.; FORDE, B. G. Glutamine synthetase polypeptides in the roots of 55 legume species in relation to their climatic origin and the partitioning of nitrate assimilation. **Plant Cell Environmental**, v. 19, p. 848-858, 1996.
- XIAOA, X. et al. Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. **Physiologia Plantarum**, v. 136, p. 150-168, 2009.
- XU, C. P.; HUANG, B. R. Root proteomic responses to heat stress in two *Agrostis* grass species contrasting in heat tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 4183-4194, 2008.
- XU, C.; HUANG, B. Comparative Analysis of Proteomic Responses to Single and Simultaneous Drought and Heat Stress for Two Kentucky Bluegrass Cultivars. **Crop Science**, v. 52, p. 1246-1260, 2011.
- Y, O. et al. Differences in the responses of stem diameter and pod thickness to drought stress during the grain filling stage in soybean plant. **Acta Physiology Plant**, v. 31, p. 271-277, 2009.
- YAMORI, W. et al. The Roles of ATP Synthase and the Cytochrome b6/f Complexes in Limiting Chloroplast electron Transport and Determining Photosynthetic Capacity. **Plant Physiology**, v. 155, p. 956-962, 2011.
- YANG, C. Y. et al. A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 139, p. 836-846, 2005.
- YOSHIMURA, K. et al. Programmed Proteome Response for Drought Avoidance/Tolerance in the Root of a C3 Xerophyte (Wild Watermelon) Under Water Deficits. **Plant Cell Physiology**, v. 49, p. 226-241, 2008.
- YOUSSEF, A. et al. Plant lipid-associated fibrillin proteins condition jasmonate production under photosynthetic stress. **The Plant Journal**, v. 61, p. 436-445, 2010.

YTTERBERG, A. J. et al. Protein Profiling of Plastoglobules in Chloroplasts and Chromoplasts. A Surprising Site for Differential Accumulation of Metabolic Enzymes. **Plant Physiology**, v. 140, p. 984-997, 2006.

ZHANG, X.-F. et al. Cochaperonin CPN20 negatively regulates abscisic acid signaling in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, v. 83, p. 205-218, 2013.

ZHOU, X. F. et al. CYCLIN H1 Regulates Drought Stress Responses and Blue Light-Induced Stomatal Opening by Inhibiting Reactive Oxygen Species Accumulation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v. 162, p. 1030-1041, 2013.

ZOZAYA-GARZA, M.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Glutamine synthetase gene isolation from an alfalfa leaf cDNA library. *Plant Physiology*, v. 119, p. 1568-1573, 1999.