

FLAVIANE SILVA COUTINHO

**ANÁLISE PROTEÔMICA E METABOLÔMICA DE SOJA: ASPECTOS  
MOLECULARES DA TOLERÂNCIA A SECA EM PLANTAS TRANSGÊNICAS  
EXPRESSANDO BIP**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C871a  
2016  
Coutinho, Flaviane Silva, 1989-  
Análise proteômica e metabolômica de soja : aspectos  
moleculares da tolerância a seca em plantas transgênicas  
expressando BiP / Flaviane Silva Coutinho. – Viçosa, MG, 2016.  
xiii, 78f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.51-65.

1. Soja. 2. Soja - Efeito da seca. 3. Proteômica.  
4. Metabólitos. 5. Plantas transgênicas. I. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.  
Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 633.34

FLAVIANE SILVA COUTINHO

**ANÁLISE PROTEÔMICA E METABOLÔMICA DE SOJA: ASPECTOS  
MOLECULARES DA TOLERÂNCIA A SECA EM PLANTAS TRANSGÊNICAS  
EXPRESSANDO BIP**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 04 de fevereiro de 2016



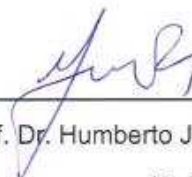
Prof.<sup>a</sup>. Dra. Elizabeth Pacheco Batista Fontes



Prof. Dr. Cleberson Ribeiro



Dr. Camilo Elber Vital



Prof. Dr. Humberto Josué de Oliveira Ramos

(Orientador)

## **DEDICATÓRIA**

A todos aqueles que estiveram ao meu lado durante essa caminhada e me deram força nos momentos de dificuldade.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que durante toda essa caminhada e por toda a minha vida tem me acompanhado e iluminado;

Aos meus pais, Joana D'arc e José Cipriano, e meus irmãos, Franciane e Leonardo, por me incentivarem e sempre me apoiarem em todas as decisões;

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica, professores e funcionários, pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação, aprendizado e boa convivência;

As agências que fomentam a pesquisa e o desenvolvimento da ciência brasileira, a CAPES pelo apoio financeiro, ao CNPq e à Fapemig pelo financiamento de projetos;

Ao Prof. Dr. Humberto Josué de Oliveira Ramos, pela sua dedicação, paciência e conhecimento passado, isso compôs uma somatória fundamental não só para a construção do pensamento que se traduz nas páginas deste texto, mas como para a maturidade de toda uma vida a seguir;

À Profa. Dr. Elizabeth Pacheco Batista Fontes por permitir o desenvolvimento deste trabalho no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas BIOAGRO/INCT-IPP;

Ao Camilo Elber Vital pela disponibilidade sempre que solicitado e grandiosa ajuda;

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e aceitação do convite;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas pelo companheirismo, ajuda e cooperação. Em especial ao Lucas Leal que esteve comigo desde o início dividindo e aprimorando conhecimento. E a Maiana Pimenta, que me ajudou na montagem e condução do experimento em casa de vegetação;

A toda equipe do Núcleo de Análises de Biomoléculas, pela paciência e grandiosa ajuda nas análises e *softwares*, meus sinceros agradecimentos;

Aos familiares e amigos que sempre depositaram confiança e contribuíram para que eu alcançasse mais essa etapa;

Enfim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	ix
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1 Soja no cenário econômico .....	3
2.2 Estresse hídrico .....	5
2.3 Proteína de ligação BiP ( <i>binding protein</i> ) .....	6
2.4 Hormônios e defesa vegetal .....	8
2.5 Proteômica .....	9
2.6 Metabolômica .....	10
2.7 Espectrometria de massas .....	11
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>13</b>
3.1 Ensaio de estresse hídrico em casa-de-vegetação .....	13
3.2 Teor relativo de água (TRA) .....	14
3.3 Proteômica .....	15
3.3.1 Extração de proteínas totais .....	15
3.3.2 Quantificação de Proteínas .....	16
3.3.3 Separação de proteínas em géis bidimensionais .....	16
3.3.4 Detecção de proteínas e análise de abundância .....	17
3.3.5 Tripsinização de proteínas .....	18
3.3.6 Identificação de proteínas por espectrometria de massas .....	19
3.4 Metabolômica .....	20
3.4.1 Extração de metabólitos para análise por GC/MS .....	20
3.4.2 Integração e visualização dos metabólitos identificados .....	22
3.4.3 Extração de metabólitos para análise de hormônios .....	23
3.4.4 Monitoramento e quantificações de hormônios .....	23
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 Ensaio de estresse hídrico em casa-de-vegetação .....	24
4.2 Efeitos do déficit hídrico no teor relativo de água (TRA) .....	26
4.3. Proteômica .....	27

4.3.1 Proteoma diferencial em resposta ao déficit hídrico nos genótipos WT e C9 .....	27
4.3.2 Proteoma diferencial entre os genótipos WT e C9 .....	30
4.4 Metabolômica .....	33
4.4.1 Perfil metabólico .....	33
4.4.2 Quantificações de Hormônios .....	39
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Área de plantio de soja no Brasil.....	04
<b>Figura 2:</b> Respostas induzidas em plantas por estresse abiótico .....	05
<b>Figura 3:</b> Componentes de um espectrômetro de massas. ....	12
<b>Figura 4.</b> Potencial hídrico em soja submetida a déficit hídrico. Plantas de soja transgênicas transformadas com gene BiP (C9) e não transformadas (WT) expostas a um regime de déficit hídrico gradual. O potencial hídrico foi aferido por meio de Bomba de Scholander até o 37° dia. Barras representam médias $\pm$ EP, e os asteriscos indicam diferenças significativas de $p \leq 0,05$ quando comparando genótipo WT e C9 no mesmo dia de observação e mesmo tratamento.....	25
<b>Figura 5.</b> Fenótipo das plantas de sojas submetidas a déficit hídrico. Plantas de soja não transformadas (WT) e transgênicas transformadas com gene BiP (C9) mantidas sob irrigação (à esquerda) e déficit hídrico (à direita), fotografadas no 36° dia de redução do suprimento diário de água.....	26
<b>Figura 6.</b> Teor relativo de água (%) nas folhas de soja. Teor relativo de água no genótipo WT e C9 submetidos a diferentes regimes hídricos. Barras representam médias $\pm$ EP. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas aos tratamentos.....	26
<b>Figura 7.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais no genótipo WT e sua identificação pelo PEAKS 7. Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do Mapman (Banco de dados: Glimax_109_peptide).....	28
<b>Figura 8.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais no genótipo C9 e sua identificação pelo PEAKS 7. Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do Mapman (Banco de dados: Glimax_109_peptide).....	30
<b>Figura 9.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais entre o genótipo WT e C9 em condições de irrigação e sua identificação pelo PEAKS 7. Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do Mapman (Banco de dados: Glimax_109_peptide).....	31
<b>Figura 10.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais entre o genótipo WT e C9 em déficit hídrico e sua identificação pelo PEAKS 7. Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do Mapman (Banco de dados: Glimax_109_peptide).....	32
<b>Figura 11.</b> Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Análise dos PLS-DA para os diferentes genótipos em condições Irrigadas (IR) e Não Irrigadas (NI), realizada pelo <i>MetaboAnalyst</i> .....	33
<b>Figura 12.</b> Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Análise dos PLS-DA para os diferentes genótipos em condições Irrigadas (IR) e Não Irrigadas (NI), realizada pelo <i>MetaboAnalyst</i> . (A) Genótipos WT e (B) Genótipos C9.....	35

<b>Figura 13.</b> Análise das variáveis importantes na projeção (VIP). Principais metabólitos responsáveis pela discriminação entre grupos de soja irrigada e não irrigada identificados pelo <i>escore</i> VIP (A) genótipo WT e (B) genótipo C9. Listando em ordem decrescente os metabólitos capazes de distinguir os tratamentos. As cores dos quadrados indicam se a abundância do metabólito esta mais alta (vermelho) ou mais baixa (verde).....	36
<b>Figura 14.</b> Representação esquemática das vias metabólicas significativamente perturbadas após a imposição do déficit hídrico. A análise foi realizada utilizando o <i>software MetaboAnalyst</i> . (A) Genótipo WT e (B) genótipo C9. Os percursos combinados dispostos por p-valor estão representados no eixo Y, e valores de impacto da via no eixo X. A cor dos círculos são classificadas de acordo com o p-valor e o tamanho revelam o impacto na via.....	37
<b>Figura 15.</b> Perfil metabólico de folhas de soja dos dois genótipos sob déficit hídrico. Os metabólitos foram identificados por GC-MS e suas abundancias expressas em termos de intensidades e normalizados pela mediana, utilizando o programa <i>MetaboAnalyst</i> . Os metabólitos com abundâncias diferenciais entre os genótipos foram determinados pelo método VIP.....	38
<b>Figura 16.</b> Quantificação dos hormônios (ng\g) (A) Ácido1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC) (B) Ácido Abscísico (C) Ácido Salicílico (D) Zeatina e (E) Ácido Jasmônico em folhas de soja. Os dados representam a média ± EP (n=3). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se aos genótipos e maiúsculas aos tratamentos.....	40
<b>Figura 17.</b> Proteínas diferenciais nos genótipos WT e C9 identificação pelo PEAKS 7. Abundância diferencial das diferentes isoformas da enzima A) Rubisco ativase 1-2/4/6 Beta Rubisco ativase, 3/5 Rubisco ativase. B) Fosfoglicerato cinase 1--4 Fosfoglecerato cinase, piruvato C) Sedoheptulose bifosfatase 1 Ausência da enzima, 2 Sedoheptulose bifosfatase D) Fosfoglicolato fosfatase 1 Ausência da enzima, 2 Fosfoglicolato fosfatase E) ferredoxina redutase 1 Ferredoxina NADP redutase 2 Ferredoxina redutase F) Superóxido dismutase e Ascorbato peroxidase 1 Superóxido dismutase, 2 Iron superóxido dismutase, 3 Ausência da enzima,4 Ascorbato peroxidase, 5 Ausência da enzima.....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Lista das transições utilizadas na análise por MRM para o monitoramento e quantificação de hormônios. São mostrados a massa do íon molecular, o fragmento analisado no MS2 e o modo em que foi feita a análise no espectrômetro QqQ.....	24
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

EUA - Estados Unidos da América

BiP - Binding protein

UPR - Unfolded Protein Response

RE - Reticulo Endoplasmático

PIB - Produto Interno Bruto

HSP70 - 70 kilodalton heat shock proteins

ABA - Ácido Abscísico

SA - Ácido Salicílico

ACC - Ácido 1-amino-ciclopropano 1-carboxílico

JA - Ácido Jasmônico

MS - Espectrometria de massas

m/z - Relação entre a massa e a carga

UFV - Universidade Federal de Viçosa

WT - Soja convencional *Glycine max.* Conquista

C9 - Sojas engenheiradas com o gene SoyBiPD

IR - Irrigado

NI - Não irrigado

PCR - Polymerase Chain Reaction

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

PMSF - Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PVPP - Polivinilpolipirrolidona

BSA - Albumina de soro bovino

°C - Grau Celsius

p\v - Relação entre o peso e o volume

v\v - Relação entre o volume e volume

% - Porcentagem

mL - Mililitro

μL - Microlitro

μm - Micrômetro

mm - Milímetro

M - Molar

Min - Minutos

h - Horas

seg - Segundos

g - Força gravitacional

cm - Centímetro

mg - Miligrama

rpm - Rotações por minuto

ψw - Potencial hídrico

TRA - Teor relativo de água

Pf - Peso fresco

Pt - Peso túrgido

Ps - Peso seco

MPa - Megapascal

kVh - Relação quilovolts por hora

V - Volts

W - Watts

mA/gel - Relação miliamperes por gel

MW - Massa molecular

SDS - Dodecil sulfato sódio

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

DTT - Ditioneitol

IEF - Focalização Isoelétrica

IPTG - Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

UPLC - Cromatografia líquida de ultra performance

LC-MS - Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

MSTFA - N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida

ESI - Ionização eletrospray

MRM - Reação múltipla de monitoramento

TCA - Ciclo do ácido cítrico

PCA - Análises de componentes principais

PLS-DA - Análises de discriminantes dos mínimos quadrados parciais

VIP - Variáveis Importantes na Projeção

## RESUMO

COUTINHO, Flaviane Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2016. **Análise Proteômica e Metabolômica de Soja: Aspectos Moleculares da Tolerância a Seca em Plantas Transgênicas Expressando BiP.** Orientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos.

Dentre os fatores ambientais, a seca é uma das principais causas na limitação da produção agrícola. Alguns fatores, como indicadores de expansão da área de plantio e alterações climáticas, evidenciam a necessidade de desenvolvimento de genótipos mais tolerantes. Nosso grupo de pesquisa na Universidade Federal de Viçosa (UFV) tem observado que a chaperona molecular BiP atua em respostas a estresses no retículo endoplasmático (ER) e osmótico, conferindo uma maior tolerância à seca. Neste trabalho, foram caracterizados os perfis proteômicos e metabólicos de plantas transgênicas de soja superexpressando a chaperona molecular BiP e de sua isolinha por eletroforese 2DE-MS e GC/MS, respectivamente. E análise de hormônios utilizando LC-MS. Plantas transgênicas apresentaram uma maior abundância relativa de proteínas relacionadas à fotossíntese, o que sustenta a hipótese que estas plantas estão predispostas geneticamente e fisiologicamente a suportar períodos de seca. Ao contrário do genótipo selvagem, plantas transgênicas não apresentaram mudanças significativas em proteínas relacionadas à glicólise, respiração e estresse oxidativo, o que evidencia uma menor percepção do estresse pelo genótipo geneticamente modificado. O acúmulo intracelular de solutos osmoticamente ativos pode ser um importante mecanismo de ajuste adotado pelas plantas transgênicas. Como evidenciado pelos perfis metabólicos, o acúmulo de aminoácidos pode ser o mecanismo responsável pela manutenção da turgescência celular no genótipo transgênico. Este mecanismo protetor pode possibilitar que a fotossíntese e outras atividades fisiológicas sejam mais operantes em condições de seca. Em condições de déficit hídrico, o ácido salicílico parece ter considerável importância em induzir efeitos de proteção na planta transgênica, podendo ter uma possível ação antagonista ao ácido jasmônico.

## ABSTRACT

COUTINHO, Flaviane Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Proteomic and Metabolomic Analysis of Soybean: Molecular Aspects of Drought Tolerance in Transgenic Plants Expressing BiP.** Adviser: Humberto Josué de Oliveira Ramos.

Among the environmental factors, drought is one of major cause in limiting agricultural production. Some factors, such as the expansion of the acreage and climate changes, highlight the need to develop more tolerant genotypes. Our research group at the Federal University of Viçosa (UFV) has observed that the molecular chaperone BiP acts in response to stress in the endoplasmic reticulum (ER) and osmotic stress, and gives greater drought tolerance. In this work we characterized the proteomic and metabolic profiles of transgenic soybean plants overexpressing the molecular chaperone BiP and its isoline by electrophoresis 2DE-MS and GC / MS, respectively. And hormones analysis using LC-MS. Transgenic plants showed a higher abundance of proteins related to photosynthesis, which supports the hypothesis that these plants are genetically and physiologically predisposed to withstand periods of drought. Unlike the wild genotype, transgenic plants showed no significant changes in proteins related to glycolysis, respiration and oxidative stress. That indicates a lower perception of the stress by the engineered genotype. The intracellular accumulation of osmotically active solutes may be an important adjustment mechanism adopted by transgenic plants. As evidenced by the metabolic profiles, the amino acid accumulation might be the mechanism responsible for the maintenance of cellular turgor in the transgenic genotype. This protective mechanism may allow photosynthesis and other physiological activities to be more active in drought conditions. In drought conditions, the salicylic acid seems to have considerable importance in protective effects in transgenic plant and may have a possible action antagonist to jasmonic acid.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de soja está entre as atividades econômicas que, nas últimas décadas, apresentou crescimento expressivo, sendo o quarto grão mais consumido e produzido globalmente, além de ser a principal oleaginosa cultivada anualmente no mundo. O grande incremento na produção de soja pode ser atribuído a diversos fatores, dentre os quais merecem destaque o elevado teor de proteínas (40%) e considerável teor de óleo (20%), além da oferta de tecnologias de produção que permitiram ampliar significativamente a área e a produtividade (HIRAKURI & LAZZAROTTO, 2014).

No contexto mundial o Brasil possui significativa participação na oferta e na demanda agroindustrial da soja sendo o segundo maior produtor ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América (EUA). O país somente não ultrapassou os EUA na safra 2013/2014, devido à seca que ocorreu na maioria dos estados produtores (CONAB, 2014). A produção de soja é muito influenciada por estresses abióticos impostos por fatores ambientais tais como seca (GRAINGER & RAJCAN, 2013; DESHMUKL *et al*, 2014).

Assim, com a crescente demanda mundial por alimento, o potencial de expansão de áreas agrícolas chegando ao fim, e a distribuição hídrica bastante variável em termos espacial e temporal se faz necessário o investimento em tecnologias que contribuam para melhor produção. Dentre as alternativas possíveis, o desenvolvimento de plantas tolerantes a déficit hídrico se torna interessante. Existem diferentes estratégias para melhorar a tolerância a déficit hídrico, dentre elas destaco a manipulação na expressão de genes, envolvidos diretamente em proteção celular (ZHU, 2001). Esta classe inclui os genes cujos produtos atuam funcionalmente em vias de desintoxicação de produtos gerados em condições de estresses, tais como os genes relacionados com o sistema antioxidativo ou em vias de reparo de proteínas e estruturas celulares como genes que codificam chaperonas moleculares (GUPTA *et al.*, 1993; BADAWI *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2006).

Nessa classe inclui a chaperona molecular *Binding protein* (BiP), localizado no retículo endoplasmático, que medeia o direcionamento de proteínas mal dobradas para a degradação, a translocação de proteínas secretoras para o lúmen do RE e a regulação da via de proteínas mal dobradas (UPR) (HAMMAN & HENDERSHO., 1998; HAIGH & JOHNSON., 2002; PINCUS *et al.*, 2010). O potencial de BiP como modulador da via UPR (BERTOLOTTI *et al.*, 2000) propicia menor detecção de estresses no RE e osmóticos nas células que parecem manter suas funções a níveis normais sob condições de estresse. Desta forma, modulando a resposta de morte celular mediada por NRPs (*N-rich proteins*), uma via específica de plantas que é sinergisticamente induzida por uma combinação de estresse do RE e sinais de estresse osmótico o que confere tolerância à seca quando superexpressa em tabaco e em soja (ALVIM *et al.*, 2001; VALENTE *et al.*, 2009). A tolerância ao déficit hídrico têm sido associado à capacidade de BiP como um regulador negativo da resposta morte celular mediada pela via NRPs induzida pelo estresse, por atenuar lesões necróticas foliares e murcha, indução de marcador do gene associada à senescência, atividade de caspases e peroxidação lipídica (REIS *et al.*, 2011; REIS & FONTES, 2012). O mecanismo pelo qual a superexpressão de BiP confere tolerância à seca em soja parece envolver a manutenção da homeostase celular por um período de tempo maior (CARVALHO *et al.*, 2014). Porém esses mecanismos de tolerância a condições adversas do meio ambiente permanecem para ser elucidados.

Portanto, uma compreensão completa de resposta das plantas ao estresse, a nível molecular é de extrema importância. O mecanismo molecular de tolerância ao estresse é complexo e a este respeito ferramentas de diferentes omicas têm sido empregadas para entender como plantas respondem a condições de estresses abióticos. Em soja, estudos de genômica e transcriptômica apresentam-se evoluídos, em contra partida outros grandes ramos como proteômica e metabolômica ainda estão atrasados (RUPESH *et al.*, 2014). Estes ramos são igualmente importantes para obter visão clara do sistema biológico e determinar os mecanismos moleculares de tolerância à seca, baseados nas análises do proteoma e do metaboloma, podendo

estabelecer algumas das bases fundamentais para estas condições fisiológicas adquiridas e ser exploradas a nível agrônomo.

Assim sendo, os objetivos deste trabalho foram a caracterização dos perfis proteicos e metabólicos de plantas transgênicas de soja superexpressando a chaperona molecular BiP e de sua respectiva planta selvagem, bem como elucidar mecanismos bioquímicos associados à tolerância ao déficit hídrico.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

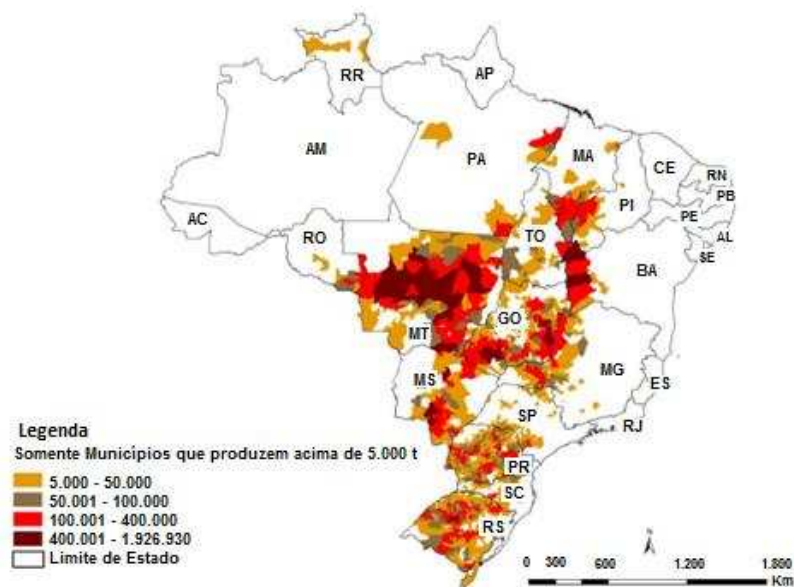
### **2.1 Soja no cenário econômico**

Nas últimas décadas, o agronegócio brasileiro tem ganhado cada vez mais relevância para a economia nacional, apresentando significativos ganhos de produtividade. Dentre as culturas agrícolas produzidas no país a soja (*Glycine max (L) Merrill*) é uma das mais importantes (EMBRAPA, 2013; GOMES, 2014).

A soja apresenta como centro de origem e domesticação o nordeste da Ásia e sua disseminação do Oriente para o Ocidente ocorreu em meio das navegações (CHUNG & SINGH, 2008). O melhoramento da cultura iniciou-se com cientistas da antiga China que, através de sucessivos processos de cruzamentos dos genótipos ancestrais, passaram a direcionar a seleção visando obter características desejadas. A soja surgiu no Brasil no início de século XX, no entanto o auge de sua produção ocorreu em meados dos anos 70, em virtude da quebra de safra da Rússia e da incapacidade dos EUA em suprir a demanda mundial. Nessa época o Brasil superou a China, que era o segundo maior produtor mundial, ficando logo atrás dos EUA (MISSÃO, 2006).

O cultivo iniciou-se na Bahia, passando pelos estados de São Paulo, mas encontrou melhor adaptação no Rio Grande do Sul, em virtude da semelhança com o clima do sul dos Estados Unidos. A produção de soja está

entre as atividades econômicas que, nas últimas décadas, apresentou crescimento expressivo, tanto no Brasil, como ao nível mundial, devido sua utilização para diversos fins, tais como alimentação humana, ração animal e produção de biocombustíveis (DALL'AGNOL *et al.*, 2010). Atualmente, o país vem se aproximando da produção americana, com potencial de se tornar o maior produtor mundial (HIRAKURI & LAZZAROTTO, 2014), sendo a soja cultivada em vários estados do país como mostrado na figura 1.



**Figura 1.** Área de plantio de soja no Brasil. Fonte: Conab/IBGE.

Nos últimos anos o Brasil registrou um prejuízo de cerca de 27 bilhões de dólares na produção de soja apenas em dois dos estados produtores: Rio Grande do Sul e Paraná, onde as plantações deixaram de produzir mais de 55 milhões de toneladas devido a períodos de seca (CONAB, 2014). Essa imprevisibilidade das variações climáticas leva ao surgimento de estresses abióticos, que são considerados um dos principais fatores de restrição à agricultura brasileira, uma vez que causam efeitos adversos no crescimento e desenvolvimento das plantas. No âmbito mundial, a seca se posiciona no primeiro lugar de desastre natural, restringindo a produção e expansão agrícola, pois mesmo uma lavoura com alto potencial produtivo torna-se muito vulnerável se houver limitações no fornecimento de água (SINCLAIR & RUFTY, 2012).

## 2.2 Déficit hídrico

A água é o principal constituinte necessário para o crescimento e desenvolvimento dos vegetais, uma vez que constitui a matriz e o meio onde ocorre a maioria dos processos bioquímicos essenciais à vida, ao mesmo tempo, em que se torna o mais limitante recurso para a produtividade agrícola. O termo estresse hídrico é definido como um fator externo, que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta levando, conseqüentemente, um desvio significativo das condições ótimas e, portanto, induzindo mudanças em todos os níveis funcionais do organismo (LARCHER, 2000).

Segundo Lichtenthaler (2006), a resposta das plantas ao déficit hídrico ocorre em quatro fases diferentes como observado na figura 2. Na primeira fase, com a introdução do estresse, a planta tem um declínio de algumas funções normais, como desempenho fotossintético. Com a manutenção do estresse, a planta entra na segunda fase de resposta, estágio de tolerância. Onde a planta começa a se acimatar às condições estressantes e podem ocorrer processos de reparação. Quando o estresse permanece depois da segunda fase, a planta entra na terceira, considerada fase de exaustão, no qual há uma alta intensidade do estresse, levando a planta a um estado crônico ou até mesmo a morte. Depois deste estágio, se retirado o estresse, a planta entra na quarta fase, com uma recuperação parcial ou total de suas funções fisiológicas.



**Figura 2.** Respostas induzidas em plantas por estresse abiótico. Fonte: Lichtenthaler (2006).

A produção agrícola em ambientes com pouca disponibilidade hídrica é afetada de maneira direta, sendo os prejuízos minimizados devido a mecanismos que permitem uma manutenção do *status* hídrico durante a redução da umidade do solo, seja por evitação ou tolerância a desidratação. Os mecanismos de evitação correspondem à manutenção do turgor e volume celular, tanto pela absorção de água por um sistema radicular abundante quanto pela redução da perda por transpiração por intermédio do fechamento estomático ou por vias não estomáticas como a cutícula. Já a tolerância é atingida por ajustamento osmótico e na maior eficiência da remoção de espécies reativas de oxigênio, formadas como consequência do metabolismo conturbado e proteção funcional das proteínas e membranas (LARCHER, 2000; ISODA & WANG, 2002; VERSLUES *et al.*, 2006; BARNABÁS *et al.*, 2008).

As modificações das plantas para aumentar a tolerância à seca estão relacionadas à ativação e regulação de genes que protegem e mantêm as funções e componentes da estrutura celular, sendo a engenharia genética uma ferramenta poderosa para melhorar a tolerância das plantas aos diferentes estresses (WANG *et al.*, 2003). Os produtos dos genes induzidos por estresse podem ser classificados em dois grupos: aqueles que protegem diretamente contra estresses e aqueles que regulam a expressão de genes e a transdução de sinais em resposta a estresse. O primeiro grupo inclui proteínas como chaperonas e proteínas detoxificadoras, que funcionam como protetores celulares contra desidratação. O segundo grupo é constituído de proteínas regulatórias, como fatores transcricionais que regulam a expressão de genes responsivos a estresses, além de proteínas cinases e fosfatases que regulam transdução de sinais (HASEGAWA *et al.*, 2000; SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000).

### **2.3 Proteína de ligação BiP (*binding protein*)**

A chaperona molecular BiP é uma proteína pertencente à família HSP70, que possui um domínio ATPase amino-terminal e um domínio carboxi-terminal

de ligação ao substrato (McKAY, 1993). Atua nos processos de dobramento de proteínas nascentes e na translocação de proteínas para o RE (FLYNN *et al.*, 1989; SCHRODER & KAUFMAN, 2005). Neste processo, as proteínas nascentes são reconhecidas por BiP, que facilita o seu enovelamento. Se as proteínas não conseguirem adquirir uma conformação adequada, BiP desencadeia uma via de sinalização para remoção destas proteínas, através de degradação, ou ativa a via UPR (NGUYEN *et al.*, 1991; SANDERS *et al.*, 1992).

Em plantas, BiP tem sua expressão aumentada em condições de estresse, tanto bióticos quanto abióticos. Quando há estresse no RE e acumulação de proteínas mal dobradas BiP ativa via UPR de duas formas em soja: primeiro BiP se dissocia dos transdutores de sinal GmbZIP 37/38, presentes na membrana do RE, que se mobilizam para o Golgi, onde são proteoliticamente clivados por S1P e S2P, se transformando em fatores de transcrição funcionais que são translocados para o núcleo, ativando promotores de genes sensíveis a estresse no RE. No outro ramo da via UPR, sob estresse RE, transdutores GmlRE1 sofrem uma dimerização ativando função de ribonuclease, que promove o *splicing* do mRNA de GmbZIP68, ativando fator de transcrição GmbZIP68S que move-se para o núcleo para induzir a expressão de genes responsivos ao estresse RE. Se a via UPR não for capaz de restaurar a homeostase do RE sob estresse prolongado vias de morte celular são ativadas (SILVA *et al.*, 2015).

Estudos tem mostrado que a superexpressão de Bip aumenta a tolerância a déficit hídrico em soja e tabaco por atenuação da via UPR, propiciando menor detecção de estresses no RE e osmóticos nas células que parecem manter suas funções a níveis normais sob condições de estresse. Desta forma, modulando resposta de morte celular mediada por NRPs, uma via específica de plantas que é sinergisticamente induzida por uma combinação de estresse do ER e sinais de estresse osmótico (KALINSKI *et al.*, 1995; LEBORGNE-CASTEL *et al.*, 1999; BERTOLOTI *et al.*, 2000; ALVIM *et al.*, 2001; VALENTE *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2011; REIS & FONTES, 2012; CARVALHO *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de estratégias moleculares no combate à seca envolve a compreensão do funcionamento desses genes (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997). Sob a visão molecular, o fenótipo pode ser descrito em termos de mRNA e proteínas, associados ao genoma e influenciados pelo ambiente. Dessa maneira, a relação entre genótipo e fenótipo torna-se bastante complexa uma vez que estudos do transcriptoma só destacam ao nível de mRNA, que pode não ser necessariamente traduzidos para os produtos finais do gene, isto é, proteínas. Diante disso, dados genômicos nem sempre representam uma imagem do processo fisiológico e a análise do mRNA é somente um pouco mais informativa (MATTICK, 2003). Os recentes avanços no campo da proteômica e metabolômica oferecem informações mais diretamente relacionadas ao estado fisiológico.

#### **2.4 Hormônios e defesa vegetal**

Os efeitos causados pelo déficit hídrico são gradualmente percebidos pelo vegetal. Os hormônios vegetais são produzidos na planta, e desempenham varias funções, dentre elas a percepção de estímulos desfavoráveis do meio ambiente e a geração de respostas adequadas que garantam a sobrevivência das plantas. Mesmo em baixas concentrações são capazes de promover, inibir ou modificar processos morfológicos e fisiológicos (CASTRO & VIEIRA, 2001; MONTANS, 2007). Os hormônios foram distribuídos em cinco classes principais: giberelinas, citocininas, auxinas, etileno e ácido abscísico (COLLI, 2008). No entanto, atualmente inclui-se o ácido salicílico, os jasmonatos, brassinosteróides, poliaminas e oligossacarinas (TAIZ & ZEIGER, 2009).

O ácido abscísico (ABA) é o mais bem estudado. Plantas submetidas à carência hídrica no solo produzem altos níveis de ABA na raiz, o qual é transportado via xilema para a parte aérea onde atua como sinal que promove o fechamento estomático, evitando a perda de água por transpiração (LIVINE & VAADIA, 1972). Por essas razões, atribui-se ao ABA como fator inicial das respostas adaptativas dos vegetais ao déficit hídrico e outros tipos de estresse,

uma vez que este se acumula em folhas de todas as espécies vegetais, independente do tipo de estresse sofrido (DAIE & CAMPBELL, 1981).

O ácido salicílico (SA) e jasmônico (JA) também estão envolvidos na regulação das respostas de defesa e sinalização das plantas frente a estresses abióticos (YASUDA *et al.*, 2008). Apesar do evidente aumento de JA em resposta aos estresses abióticos em várias espécies de plantas, seu papel em resposta ao déficit hídrico ainda é pouco conhecido (DOMBROWSKI., 2003; GAO *et al.*, 2004; OLLAS *et al.*, 2015). O SA desempenha um papel fundamental na tolerância ao déficit hídrico. Interesses consideráveis têm sido focados neste ácido, devido à sua capacidade de induzir efeitos de proteção por elevar ou regular a atividade de enzimas de desintoxicação celular, como peroxidases e superóxido dismutases, que estão especialmente envolvidas na degradação de radicais ativos oxigenados (ARBONA & GOMEZ-CADENAS, 2008; AZOOZ & YOUSSEF, 2010; BROSSA *et al.*, 2011).

Durante muito tempo, os hormônios foram considerados como entidades operacionais distintas com padrão de ação e efeitos fisiológicos bem diferenciados. Recentemente, foi proposto o conceito de *crosstalk*, uma vez que perturbações genéticas no padrão de resposta de um hormônio podem causar mudanças na síntese ou degradação de outros hormônios (ALONSO & ECKER, 2007). Ou ainda, diferentes vias de transdução do sinal podem compartilhar componentes sinalizadores levando ao surgimento de uma complexa rede que envolve várias respostas de defesa e processos de desenvolvimento (MARTÍN, 2009). Diante disso, a detecção e quantificação dessas moléculas é de extrema importância para o entendimento fisiológico de defesa e tolerância do vegetal ao estresse.

## **2.5 Proteômica**

A proteômica é o conceito dado à análise sistemática, em larga escala, que visa caracterizar proteínas expressas em um determinado período

biológico, seja pela abundância, atividade, modificações pós-traducionais ou pela interação entre as proteínas (WRIGHT *et al.*, 2012).

Essa técnica tem se mostrado eficiente no estudo de mecanismos de tolerância das plantas a estresses ambientais (VINCENT *et al.*, 2007). Por meio dessa abordagem, o perfil global de expressão de proteínas tem sido investigado utilizando eletroforese bidimensional (2DE) combinadas com espectrometria de massas (MS) (WESTERMEIER *et al.*, 2002; HAN & WANG, 2008). Assim, mudanças específicas no perfil de proteínas, oferecem a possibilidade de identificação e caracterização funcional das proteínas diferencialmente expressas cujas funções biológicas estão relacionadas com a tolerância (BENEVENTI, 2010), levando ao entendimento dos mecanismos moleculares que governam as respostas ao estresse (GONZÁLEZ *et al.*, 2010; JORRÍN-NOVO *et al.*, 2009; SOARES, 2013).

As áreas da proteômica e metabolômica auxiliam no entendimento de processos biológicos e fornecem um panorama sobre o estado das plantas em resposta a determinadas condições ambientais. A combinação de dados abrangentes na expressão e regulação do proteoma, bem como de vias metabólicas, permitem uma visão integrada e sistemática que proporciona uma compreensão mais aprofundada sobre a organização e funcionamento do sistema biológico (BARCHET, 2011).

## **2.6 Metabolômica**

Metaboloma foi primeiramente sugerida por Stephen Oliver e colaboradores (1998) para designar o conjunto de compostos de baixa massa molecular sintetizados por um organismo. Algum tempo depois, Fiehn definiu metabolômica como o estudo de todos os compostos químicos de baixa massa molecular presentes em um organismo, e que são os produtos finais das funções celulares, cujos níveis podem ser vistos como respostas dos sistemas biológicos a alterações ambientais ou genéticas (FIEHN, 2002). Estes compostos são intermediários de reações químicas e desempenham um papel

importante na conexão das diferentes rotas que operam em um sistema vivo (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005). Da mesma forma que o proteoma e o transcriptoma, o metaboloma é dinâmico e, os níveis de cada metabólito dependem do estágio de desenvolvimento, condições fisiológicas, bem como do estado patológico de uma célula, tecido ou organismo.

Por meio da análise metabolômica é possível descrever quais são os metabólitos presentes em um organismo e suas concentrações, relativas e absolutas, de acordo com o ambiente em que ele se encontra, de forma a obter informações sobre os processos metabólicos ativos (PINTO *et al.*, 2002).

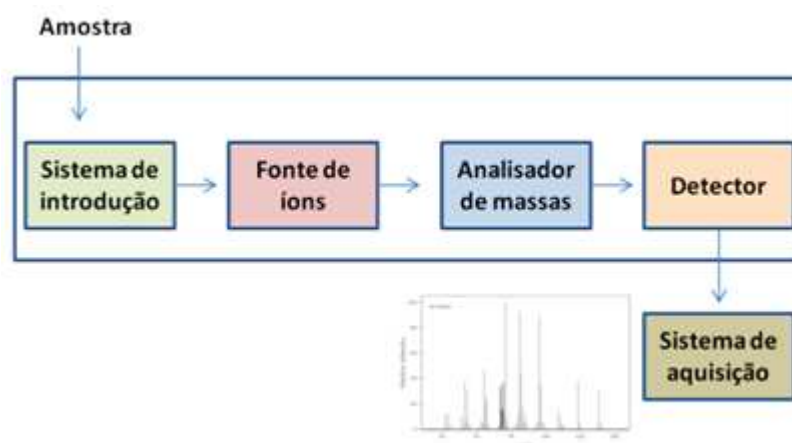
Existem duas estratégias principais para análise metabolômica: i) análise de metabólitos alvo (*target*), muito utilizada em análise quantitativa de uma classe pré-estabelecida de compostos, relacionada a rotas metabólicas específicas e, ii) perfil metabólico (*fingerprint*), que envolve análise em larga escala para a identificação de metabólitos. Nesta abordagem, um perfil cobrindo um grande número de metabólitos é gerado por uma técnica analítica selecionada ou uma combinação, e é utilizado para identificar metabólitos com níveis alterados em função de uma determinada condição ambiental (VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005). A complexidade metabólica é geralmente analisada por técnicas hífenadas (combinação de duas ou mais técnicas analíticas) como CG-MS e LC-MC por apresentarem melhor seletividade e eficiente (RODRIGUES *et al.*, 2006; DIXON *et al.* 2006).

A metabolômica de plantas ainda é um campo novo, mas com grandes oportunidades já que é capaz de caracterizar e diferenciar genótipos e fenótipos baseados nos níveis de metabólitos, pois qualquer alteração ocorrida no ambiente pode ser acompanhada pela alteração do perfil e níveis destes compostos (MALONEY, 2004).

## **2.7 Espectrometria de massas**

Muitas tecnologias analíticas têm sido utilizadas para a identificação e obtenção dos perfis proteicos e metabólicos, entretanto a espectrometria de

massas (MS) é a mais aplicada. Nesta técnica as massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas são determinadas. De uma forma geral, o comportamento do analito, na forma de íons, em um campo elétrico ou magnético é utilizado para determinar a relação entre a massa e a carga ( $m/z$ ) (AEBERSOLD & MANN, 2003). De uma maneira simplificada, um espectrômetro de massas irá possuir uma fonte de ionização, para a obtenção de íons, um analisador de massas, o qual determina a relação  $m/z$  e, um detector para gerar sinais eletrônicos da presença dos íons formados. Sistemas eletrônicos e modo de operação e aquisição dos dados são gerenciados por *softwares*, como ilustrado na figura 3.



**Figura 3.** Componentes de um espectrômetro de massas. Fonte: Adaptado de SKOOG *et al.*, 2002.

Estratégias analíticas empregando a espectrometria de massas tem se tornado componentes fundamentais em proteômica e metabolômica, principalmente por oferecerem excelente combinação de sensibilidade e seletividade, tornando-se uma plataforma indispensável em Biologia de Sistemas (BEDAIR & SUMNER, 2008; LEI *et al.*, 2011). Em função da amplitude de possibilidades em aplicações em bioquímica, diversas plataformas analíticas têm sido desenvolvidas pelos fabricantes, de modo a otimizar a eficiência em termos de equipamentos complexos com elevada sensibilidade, precisão e acurácia. Desta forma, abordagens analíticas empregadas tem evoluído consideravelmente, principalmente pela diversidade

e combinação de analisadores, bem como acoplagem a equipamentos de separação de moléculas, tais como cromatografia gasosa e líquida (ABDELNUR *et al.*, 2008).

O emprego da cromatografia acoplada à espectrometria de massas apresenta-se vantajoso, uma vez que possibilita a análise de uma grande quantidade de moléculas distintas de modo contínuo, gerando informação quantitativa e qualitativa, seja na forma de obtenção de sequências de peptídeos ou identificação de metabólitos na amostra. Esta abordagem possibilita a identificação com elevada exatidão de moléculas, seja de baixa massa ou alta massa, ao contrário de estratégias convencionais que utilizam apenas índices de retenção dos compostos gerados por técnicas de detecção cromatográficas (VEKEY, 2001).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Ensaios de déficit hídrico em casa-de-vegetação**

O experimento de restrição hídrica foi conduzido em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG no período de novembro à janeiro. Para isso, sementes de soja (*Glycine max*. Conquista) transformadas com o gene SoyBiPD sob controle do promotor 35S do *Cauliflower mosaic* vírus (35S::BiP-4; VALENTE *et al.*, 2009) e sementes de soja não transformadas (*Glycine max* cv. Conquista), denominadas C9 e WT respectivamente, foram semeadas em vasos de plástico contendo uma mistura de solo, esterco e areia previamente esterilizados (3:1:1). As plantas foram mantidas sob condições naturais de luz, umidade relativa (65-85%) e temperatura (15-35°C). Após a germinação, foi realizada análise para certificar a presença do transgene nas plantas geneticamente modificadas. Foi utilizando a técnica de PCR a partir de DNA genômico da folha, com oligonucleotídeos específicos para amplificação do transgene. O produto da amplificação foi analisado por eletroforese de agarose 1% (p/v), cuja presença confirmou a transgenia (dados não mostrados).

Após confirmação, as plantas foram transplantadas para vasos de 3 L e cultivadas com fornecimento normal de água. Quando o terceiro trifólio estava completamente expandido, iniciou o experimento de restrição hídrica, onde água foi adicionada até a capacidade de campo em todos os vasos. Após o excesso de água ser drenado pela gravidade, cada vaso foi pesado e submetido a um delineamento experimental em blocos ao acaso. Nas parcelas experimentais foram distribuídos seis genótipos de soja convencionais (WT) e seis de sojas transformadas (C9), e submetidas a dois regimes de disponibilidade hídrica: três plantas de cada genótipo receberam irrigação plena à capacidade de campo e três foram submetidos à restrição hídrica por diminuição gradativa da irrigação. Os tratamentos foram denominados irrigados (IR) e não irrigados (NI). Os vasos foram pesados todos os dias e calculados o peso de água perdida. Em vasos normalmente irrigados, foram adicionados 180 mL de água, quantidade suficiente para não encharcar o solo. Aos vasos submetidos ao déficit hídrico foi adicionado 40% de água do volume perdido a cada dia (VALENTE *et al.*, 2009).

O estado de água nas folhas das plantas foi monitorado por meio da determinação do potencial hídrico ( $\psi_w$ ) pela madrugada, utilizando Bomba Scholander (SCHOLANDER *et al.*, 1965). A coleta das folhas foi realizada em nitrogênio líquido quando as plantas transgênicas apresentavam um potencial hídrico próximo de -1 MPa e armazenadas em *freezer* -80°C.

### **3.2 Teor relativo de água (TRA)**

O TRA foi calculado segundo Silva e colaboradores (2007), baseado no peso fresco (Pf), peso túrgido (Pt) e peso seco (Ps) aplicados na fórmula:

$$\text{TRA} = (\text{Pf} - \text{Ps}) / (\text{Pt} - \text{Ps}) * 100$$

Para isso, três discos foliares das folhas foram coletados quando as mesmas apresentavam potencial hídrico de -0,5 e -1,0 MPa e imediatamente pesados (Pf) seguido de imersão em água deionizada em ambiente protegido da luz por 12 h à aproximadamente 24°C. Os discos foram secos com papel

absorvente para retirada do excesso de água e pesados (Pt). Por fim, foram completamente secos em estufa de circulação forçada por 48 h a 80°C, resfriados a temperatura ambiente e novamente pesados (Ps).

### **3.3 Proteômica**

#### **3.3.1 Extração de proteínas totais**

Foi utilizado o protocolo descrito por Wang e colaboradores (2003) com algumas alterações. Aproximadamente 3,0 g de material vegetal coletado foram trituradas em nitrogênio líquido e ressuscitado em 10 mL de solução contendo polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (m/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 2% (v/v) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM em acetona gelada. Os tubos foram agitados em vortex por 30 s e mantidos em gelo por 30 min. Em seguida, as amostras foram sonicadas por cinco vezes com 30% da potência máxima em intervalos de 20 s, em banho de gelo.

Após sonicação, as amostras foram centrifugadas a 6.000 g, 4 °C por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado cinco vezes com acetona gelada. Após centrifugação, o material foi lavado por quatro vezes com 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% em acetona gelada e centrifugado a 6.000 g, 4 °C por 15 min. Para cada etapa de lavagem o material foi agitado por 30 s em vortex. Em seguida, o material foi lavado duas vezes com TCA 10% em água, duas vezes em acetona 80% e uma vez em etanol 70% e seco à temperatura ambiente. O precipitado foi então ressuscitado em 10 mL de tampão de extração contendo SDS-denso (sacarose 30%, SDS 2%, Tris-HCl 0,1 M pH 8,0), PMSF 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2% (v/v) e deixado em repouso por 15 min a temperatura ambiente. Após 15 min foi adicionado 5 mL de fenol tamponado pH 8,0 e o material foi mantido em gelo por 10 min. Os tubos foram agitados em vortex a cada 2 min para maximização do contato entre a solução aquosa e o fenol.

Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 6.000 g a 4 °C por 15 min e a fração fenólica coletada e transferida para um novo tubo. As proteínas da fase fenólica foram precipitadas adicionando-se cinco volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol gelado e incubadas por 12 horas a -20° C. Em seguida, o extrato foi centrifugado por 6.000 g a 4 °C por 15 min. O precipitado recuperado foi lavado duas vezes em acetato de amônio 0,1 M em metanol, duas vezes em acetona 80% e mais uma vez em etanol 70%. A cada etapa de lavagem, o precipitado foi ressuscitado e centrifugado por 6.000 g a 4 °C por 15 min. O precipitado final foi seco à temperatura ambiente e armazenado a -20 °C até o uso.

### **3.3.2 Quantificação de Proteínas**

As amostras proteicas foram solubilizadas em 300 µL de solução contendo ureia 7 M, tioureia 2 M, CHAPS 4% e sonicadas em gelo por 5 ciclos de 20 seg a 60% da potência máxima. A concentração de proteínas foi avaliada de acordo com Bradford (1976). A curva de calibração foi feita a partir de um padrão de albumina de soro bovino (BSA) na faixa de concentração entre 1 -15 µg /µL diluído com o mesmo tampão utilizado na diluição das amostras.

### **3.3.3 Separação de proteínas em géis bidimensionais**

A focalização isoeétrica (IEF) foi realizada em fitas de 13 cm com gradientes de anfólitos entre o pH 3-10 (GE *Healthcare*). Inicialmente, as fitas foram reidratadas por 14-20 h em 300 µL de tampão de reidratação (7 M ureia, 2 M tioureia, 2% CHAPS, 0.002% azul de bromofenol, 2% IPG-buffer, 0.2% DTT) contendo 1,0 mg de proteína das amostras. A IEF foi realizada em um sistema IPGphor (GE *Healthcare Upsala*, Suécia) a 20°C seguindo a programação: acúmulo de 0.5 kVh a 500 V, gradiente de 0.8 kVh a 1000 V, gradiente 13.5 kVh a 8000 V e voltagem fixa 40 kVh a 8000 V. Anteriormente a segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em duas etapas

individualmente por 30 min em 5 mL de solução de equilíbrio (6 M ureia, 30% glicerol, 2% SDS, 0.002% azul de bromofenol, 50 mM Tris-HCl pH 8.8) contendo 1% de DTT (etapa de redução) e 2,5% de iodoacetamida (etapa de alquilação), respectivamente.

A segunda dimensão foi efetuada em gel de poliacrilamida 12,5% na presença de SDS (SDS-PAGE), utilizando a metodologia descrita por Laemmli (1970). As fitas equilibradas e lavadas foram pressionadas no topo do gel, ao lado ácido da fita adicionaram 7 µL de marcador de massa molecular (MW) aderido a um papel de filtro. A fita e o papel de filtro MW foram selados com solução de agarose 0,5%, bromofenol 0,002%.

O aparato eletroforético foi montado como sugerido pelo fabricante e a corrida realizada em cuba Rubi (GE *Healthcare*), com uma primeira etapa de amperagem fixa de 20 mA/gel, e potência máxima de 50W por 30 min e em seguida a 40 mA/gel, 50W, 150V por 5 h. A temperatura foi mantida a 10°C utilizando circulador termostático.

### **3.3.4 Detecção de proteínas e análise de abundância**

Para a caracterização do proteoma diferencial os géis foram submetidos à coloração para visualização de proteínas. Imediatamente após a corrida, os géis foram colocados em solução de fixação (ácido acético 10% (v/v)) e etanol 40% (v/v)) por 12 h sob agitação constante. Terminada a etapa de fixação, os géis foram corados com solução *Coomassie blue* G-250 (sulfato de amônia 8% (v/v), ácido fosfórico 0,8% (v/v), *Coomassie blue* G-250 0,08% (v/v), metanol 20%(v/v)) (Sigma- Aldrich) por 72 h e lavados com ácido acético 1% (v/v) até a eliminação completa do corante excedente. As imagens dos géis foram digitalizadas utilizando um escâner *ImageScanner* III (GE *Healthcare*) e calibradas com o programa *Labscan* (GE *Healthcare*). Os perfis ente os tratamentos irrigado e não irrigado, para ambos genótipos, foram comparados utilizando o *software ImageMaster2D Platium 7* (GE *Healthcare*) para determinação de *spots* proteicos com abundância diferencial. Foram

considerados diferenciais os *spots* que apresentaram uma variação de sobreposição de medidas acima de 1,0 (*Ratio*), ANOVA com p-valor menor que 0,05 e que estavam presentes nos três géis (repetições biológicas). Para os *spots* diferenciais foi calculada a porcentagem de volume e a comparação desses valores indicou a diferença na abundância entre os tratamentos.

### 3.3.5 Tripsinização de proteínas

Os *spots* de interesse foram retirados do gel com o auxílio de um estilete, previamente lavado em metanol, e colocados em microtubos identificados. Os fragmentos de gel foram descolorados através de sucessivas lavagens em solução de acetonitrila 50%, bicarbonato de amônio 25 mM, descartando o sobrenadante. As lavagens foram realizadas à temperatura ambiente.

A solução de descoloração foi removida e os pedaços de gel desidratados com acetonitrila por 5 min (2 vezes) e secos em *speed vac* por 15 min. As proteínas foram, então reduzidas em solução de DTT 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min a 56°C utilizando banho seco. Em seguida, alquiladas em solução de iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio a 100 mM por 30 min à temperatura ambiente na ausência de luz. Os pedaços de gel foram lavados com bicarbonato de amônio 100 mM por 10 min por 2 vezes, desidratados em acetonitrila por 5 min e secos em *speed vac* por 15 min.

Para a digestão enzimática, os géis foram reidratados com solução contendo tripsina (*Trypsin, from porcine pancreas, Proteomics grade* - Sigma) 20 ng/mL em solução de bicarbonato de amônio 40 mM pH 8,0 e acetonitrila 10%. Adicionaram 15 µL da solução com enzima a cada *spot* e submeteu-as a banho de gelo durante 45 min para penetração no gel. Decorrido esse tempo, adicionaram 50 µL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM e incubou a 37°C por 16h.

Posteriormente, os pedaços de gel foram submetidos a banho ultrassom por 10 min, centrifugados a 1500 rpm por 2 min e a solução removida para novos tubos. Aos pedaços de gel restantes foram adicionados 40 µL de solução de ácido fórmico 5%, acetonitrila 50% para recuperar uma maior quantidade de fragmentos tripticos. Os tubos foram novamente submetidos a banho ultrassom por 10 min, centrifugados e a solução removida e adicionada ao tubo novo. A solução triptica foi concentrada em *speed vac* até secagem total.

### 3.3.6 Identificação de proteínas por espectrometria de massas

Para a identificação das proteínas diferencialmente expressas, primeiramente, as amostras tripsinizadas e secas foram solubilizadas em solução de ácido fórmico 0,1%. Após a solubilização, 10 µL foram usados para a análise por LC-MS, utilizando um sistema UPLC (nanoAcquity-Waters), contendo uma coluna *trap* e uma coluna capilar C18 BEH130 1,7 µm -100 µm × 100 mm operando com uma taxa de fluxo de 0,5 µL/min. Os peptídeos eluídos foram automaticamente injetados em espectrômetro de massas do tipo *ION TRAP* (Amazon-Bruker), atuando no modo *online*, usando uma agulha de ionização nanoESI. As soluções da fase móvel utilizados para o programa de gradiente foram: água e ácido fórmico 0,1% (v/v) (A) e acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v) (B). A programação de gradiente consistiu de 5 % de B durante 5 min, rampa de subida linear até 50% de B em 35 min, rampa de subida linear até 90% de B ao longo de 10 min, manutenção de 95% de B por 10 min, rampa de descida linear para 5% de B durante 5min, seguido pela manutenção a 5% de B durante 5 min. O escaneamento dos íons realizado pelo espectrômetro massas foi entre 300 e 1500 m/z em modo positivo e os dados foram adquiridos durante 70 min em cada análise LC-MS/MS. O espectrômetro de massas operou no modo auto-MS<sub>n</sub>, o qual coletou espectros MS<sub>2</sub> para os íons mais intensos em cada espectro de varredura completo, excluindo os íons de cargas simples. A aquisição dos dados do instrumento LC-MS foi gerida pelo *software Hystar* (Bruker) e os espectros foram

processados com o *software Data Analysis* (Bruker) utilizando as configurações padrões para proteômica.

Os espectros foram analisados pelo programa PEAKS 7 com uma licença de *Client* local, conectado com um servidor remoto, para identificação de proteínas pelo método de *sequenciamento de novo* assistido por *software* e pesquisa em banco de dados de sequências de proteínas de soja. Os parâmetros utilizados no programa foram: lista de proteínas em formato fasta obtidos do site *Phytozome*, contendo todas as proteínas descritas para soja como banco de dado, oxidação da metionina como uma modificação variável, carbamidometilação da cisteína como modificação fixa, uma clivagem perdida, estados de cargas de 2+, 3+, 4+, tripsina como enzima de clivagem e erro de massa de 0.15Da. Foram consideradas como positivos verdadeiros, identificações com FDR menor que 1,0% e com pelo menos dois peptídeos sequenciados.

### **3.4 Metabolômica**

#### **3.4.1 Extração de metabólitos para análise por GC/MS**

As amostras de folhas foram trituradas em nitrogênio líquido e posteriormente 50 mg material foi pesado em microtubos de 2,0 mL. Em seguida, adicionaram 1,5 mL de solução extratora gelada (água 1: metanol 2,5: clorofórmio 1) contendo 60 µL de ribitol (0,2 mg/mL em água ultra pura) como normalizador interno. As amostras foram agitadas em vortex por 30 min a 4°C, centrifugadas a 14.000 g por 5 min e o sobrenadante foi coletado para novo tubo. Adicionaram 750 µL de água ultra pura ao sobrenadante, seguido de vortex e centrifugação por 15 min a 14.000 g. Em seguida, aproximadamente, 500 µL da fase superior polar foram coletados para novos tubos. As amostras foram fracionadas em volumes de 50 µL e secas em *speed vac*. A derivatização das amostras foi realizada pela adição de 40µL de piridina (Merck) contendo metoxiamina hidrocloreto (20 mg/mL) (Sigma) submetendo-

as a 37°C por 2 h sob agitação. Em seguida, foram adicionados 70 µL da solução de MSTFA (20 µL/mL da mistura padrão do tempo de retenção), previamente preparada seguindo Lisec e colaboradores (2006) e mantidas a 37°C por 30 min. Adicionaram 100 µL da amostra derivatizada a *vials* específicos para análise no sistema GC-MS.

As amostras foram analisadas utilizando um sistema GC-MS pertencente ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da UFV, com as seguintes especificações: GC Cromatógrafo Agilent, 7890A e Espectrômetro TruTOF® HT TOFMS, Leco, equipado com uma coluna capilar de 30 mm (MDN-35) operando de acordo com Lisec e colaboradores (2006). Amostras de 1 µL foram injetadas no modo *splitless* a 230°C carregado pelo fluxo de gás (fluxo contínuo de hélio) de 2 mL/min. A temperatura do forno foi inicialmente mantida constante a 80°C e, em seguida, aumentou-se 15°C/min até alcançar 330°C, sendo essa temperatura mantida durante 5 min.

Os cromatogramas gerados tiveram a linha de base corrigida e alinhada pelo programa *CromaTof* (Agilent). Neste processamento, foi também gerado uma lista contendo os tempos de retenção cromatográfica dos padrões internos (n-alcenos), utilizados para cálculo dos índices de retenção de cada íon fragmentado. Os espectros de GC/MS foram exportados com o formato .cdf e os perfis foram analisados, de modo automático, pelo programa *TargetSearch*. Foi utilizado um *script* para identificação e quantificação de metabólitos, desenvolvido para rodar no R (CUADROS-INOSTROZA *et al.*, 2009) e com parâmetros de processamento e alinhamento otimizados para a plataforma GC/TOF Agilent. Os parâmetros utilizados foram os seguintes: *massRange* (faixa de massas) de 85-500 Da; *IntThreshold* (intensidade mínima) de 50; *TopMasses* (10 massas mais intensas) de 10; *r thresh* (correlação acima) de 0,05. Foi utilizada para identificação dos metabólitos a biblioteca de fragmentação por impacto eletrônico (EI) e de índices de retenção (RI) GMDb\_FAMELib\_TS\_20110228\_IS.txt, geradas pela *GMD Mass Spectrum Reference Library* (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/download/>). Uma tabela de identificação e intensidades não normalizada foi utilizada como dados de

entrada para o processamento e análises estatísticas pela plataforma MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>).

### 3.4.2 Integração e visualização dos metabólitos identificados

A tabela de identificação e intensidades gerada foi utilizada como dados de entrada para identificação de metabólitos diferenciais e gerar mapas de visualização das vias metabólicas significativamente perturbadas com a seca utilizando o *software* MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>), os valores das intensidades foram normalizados pela mediana.

Primeiramente foram realizadas análises estatísticas utilizando o comando *Statistical Analysis*. Uma análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi realizada com a finalidade de separação entre amostras. Este é um teste multivariado supervisionado, fundamental para cálculos complexos e confiáveis a fim de minimizar as chances de erro de predições, e maximizar a confiabilidade do modelo de classificação. Usando múltiplas técnicas de regressão multivariada para extrair, via combinação linear de variáveis originais (x), a informação que pode predizer os membros de cada classe (y) levando a separação \formação de grupos nas amostras analisadas.

Para identificar os metabólitos responsáveis pela discriminação entre os tratamentos, a tabela de identificação e intensidades para cada genótipo contendo os dois tratamentos foi submetida, separadamente, a uma análise de *fold-change* que informa o valor da razão de expressão em logaritmo de base 2 (*log<sub>2</sub> fold-change*) de uma condição em relação à outra. Especificamente, foram considerados metabólitos diferenciais aqueles que o valor de *fold-change* ultrapassasse o *threshold* de 2 e p-valor menor que 0,05. Com esses resultados foi criada uma nova tabela que serviu como dados de entrada para análise de PLS-DA para cada genótipo e análise de variáveis importantes na projeção (VIP). As 50 VIP principais foram selecionadas e então submetidas à análise de via metabólicas a fim de encontrar vias significativamente

perturbadas entre os tratamentos utilizando o comando *Pathway Analysis*, biblioteca *Arabidopsis thaliana (thale cress)*.

### **3.4.3 Extração de metabólitos para análise de hormônios**

As amostras de folhas foram trituradas em nitrogênio líquido para rompimento do material vegetal. Em seguida foram adicionados 400 µL de uma solução extratora (metanol 20% - Isopropanol 79% - ácido acético 1%) a 110 mg de material vegetal. Nessa etapa, foi adicionado ácido naftaleno acético (NAA) como normalizador interno na concentração de 50 ng/g.

Cada amostra foi vortexada 4 vezes por 20 seg, mantendo-as no gelo, e sonicadas em ultrassom por 5 min a 4°C. As amostras foram deixadas no gelo por 30 min e sonicadas em ultrassom por 5 min e centrifugadas 14.000 g por 30 min a 4°C para que os restos celulares se sedimentassem.

Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para novos tubos. Um novo ciclo de extração foi realizado com o precipitado da extração anterior para maximizar a eficiência de extração. As amostras contendo os hormônios extraídos foram armazenadas a -80°C até o momento da análise por LC/MS do tipo UHPLC QqQ.

### **3.4.4 Monitoramento e quantificações de hormônios**

Aproximadamente 300 µL das amostras extraídas foram colocadas em *vials* e 5,0 µL dos extratos foram injetado no sistema LC/MS pertencente ao NuBioMol do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da UFV. Utilizou-se a coluna cromatográfica (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1.8 µm, 2.1x50 mm) com fluxo de 0,3 mL/min, acoplada *online* a um espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo QqQ (Agilent). O espectrômetro de massa operou alternando o modo positivo e negativo de acordo com tempo de retenção para cada hormônio e escaneou a amostra no modo MRM (*multiple*

*reaction monitoring*) para detecção de cada hormônio como mostrado na Tabela 1. Os ensaios foram realizados para três réplicas biológicas para cada tratamento.

Os espectros de massas gerados foram processados utilizando o *software* MassHunter para obtenção dos cromatogramas extraído (XIC) de cada transição e para obtenção dos valores de área como indicativo da abundância de cada hormônio. Uma curva padrão de cada hormônio, variando concentrações de 0,1 a 300 ng/mL, foi utilizada para converter os valores de área em quantidade massas em ng/g de tecido vegetal.

**Tabela 1.** Lista das transições utilizadas na análise por MRM para o monitoramento e quantificação de hormônios. São mostrados a massa do íon molecular, o fragmento analisado no MS2 e o modo em que foi feita a análise no espectrômetro QqQ.

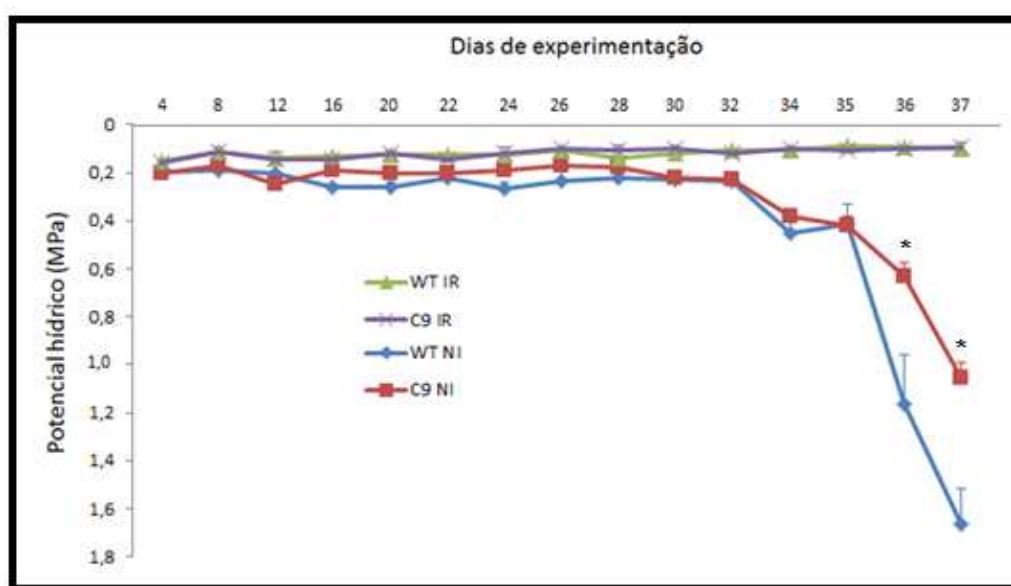
Hormônio	Íon Precursor	Fragmento	Modo
Zeatina	220	202	Positivo
ACC	102	56	Positivo
Ácido Salicílico	137	93	Negativo
Ácido Abscísico	263	153	Negativo
Ácido 1-naftalene acético	185	141	Negativo
Ácido Jasmônico	209	59	Negativo

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Ensaios de estresse hídrico em casa-de-vegetação

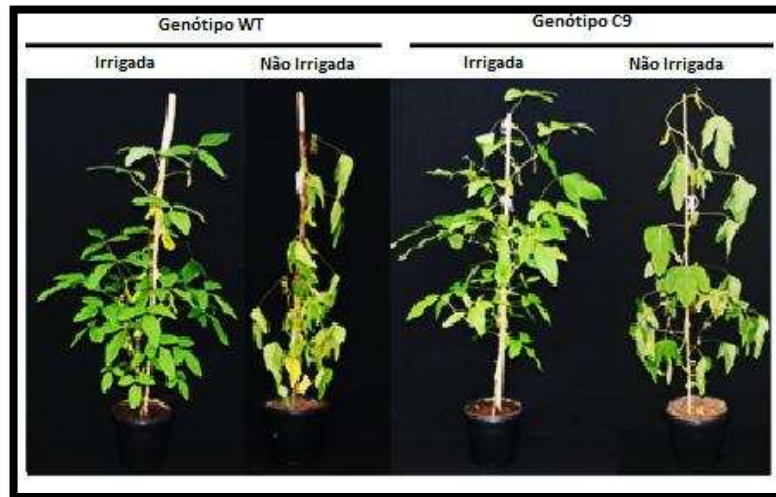
Para avaliar a diferença de resposta à seca entre os genótipos, as plantas foram submetidas a um regime de déficit hídrico lento durante um período de 37 dias. O turgor das folhas foi monitorado por meio de medições periódicas do potencial hídrico ( $\psi_w$ ), medido pela madrugada, com Bomba *Scholander* (SCHOLANDER *et al.*, 1965).

As plantas de ambos os genótipos de soja submetidos ao tratamento de irrigação mantiveram seu  $\psi_w$  superior a  $-0,16$  MPa por todo período experimental. Nas plantas submetidas ao tratamento de déficit hídrico observou-se a partir do 32º dia uma redução progressiva do  $\psi_w$ , sendo essa redução mais acelerada no genótipo WT. Enquanto o genótipo C9 apresentava valores próximos a  $-1,0$  MPa, o genótipo WT apresentava  $-1,8$  MPa no 37º dia de experimentação (Figura 4). Revelando que o genótipo C9 manteve maiores níveis de potencial hídrico, por consequência, maior hidratação que o genótipo WT no mesmo tempo de progressão do estresse.



**Figura 4.** Potencial hídrico em soja submetida a déficit hídrico. Plantas de soja transgênicas transformadas com gene BiP (C9) e não transformadas (WT) expostas a um regime de déficit hídrico gradual. O potencial hídrico foi aferido por meio de Bomba de *Scholander* até o 37º dia. Barras representam médias  $\pm$  EP, e os asteriscos indicam diferenças significativas de  $p \leq 0,05$  quando comparando genótipo WT e C9 no mesmo dia de observação e mesmo tratamento.

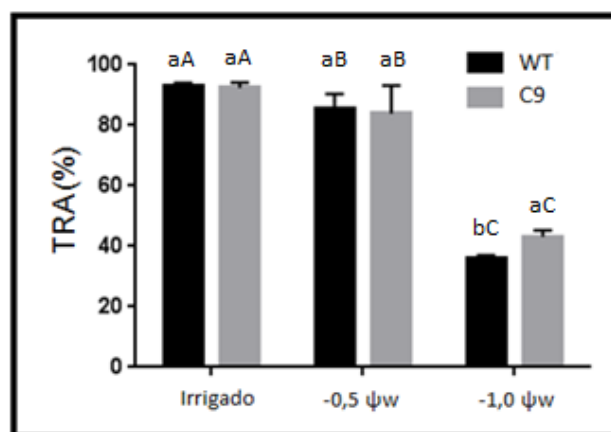
Após 36º dia de redução do suprimento diário de água, foi possível observar diferenças fenotípicas de turgidez entre plantas transformadas e não transformadas (Figura 5). O genótipo C9 apresentou um  $\psi_w = -0,63$  MPa enquanto que o genótipo WT apresentou  $\psi_w = -1,16$  MPa, indicando que a superexpressão de BiP no genótipo C9 protege contra desidratação.



**Figura 5.** Fenótipo das plantas de soja submetidas a déficit hídrico. Plantas de soja não transformadas (WT) e transgênicas transformadas com gene BiP (C9) mantidas sob irrigação (à esquerda) e déficit hídrico (à direita), fotografadas no 36° dia de redução do suprimento diário de água.

#### 4.2 Efeitos do déficit hídrico no teor relativo de água (TRA)

O déficit hídrico ocasionou a redução do TRA em ambas os genótipos (Figura 6). A maior tolerância do genótipo C9 pode ser observada no  $\psi_w = -1\text{MPa}$ , onde apresentou menor desidratação nas folhas. Isto demonstra uma maior capacidade de manutenção da quantidade de água, indicando a existência de mecanismos de tolerância à seca.



**Figura 6.** Teor relativo de água (%) nas folhas de soja. Teor relativo de água no genótipo WT e C9 submetidos a diferentes regimes hídricos. Barras representam médias  $\pm$  EP. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas aos tratamentos.

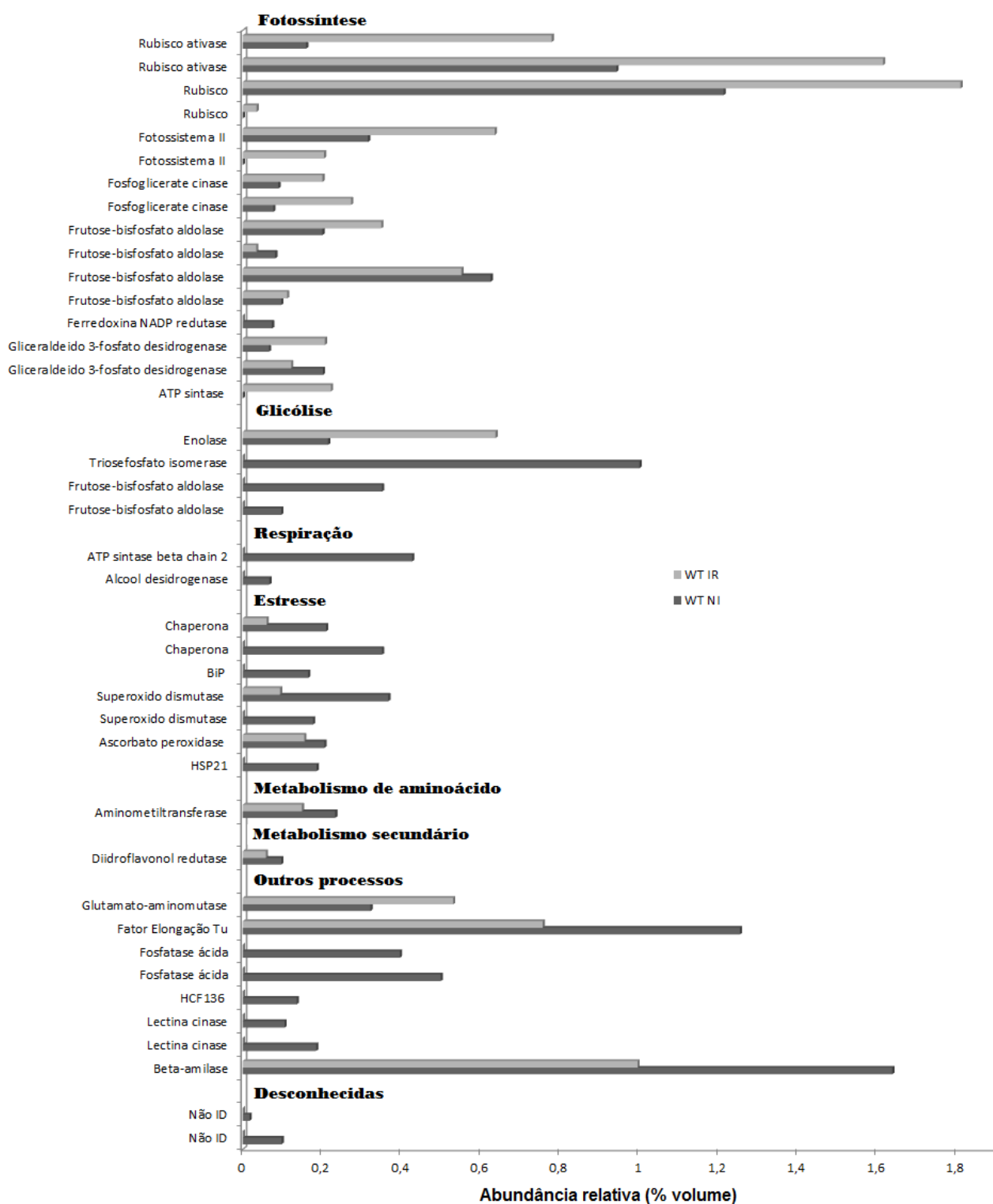
### 4.3. Proteômica

#### 4.3.1 Proteoma diferencial em resposta ao déficit hídrico nos genótipos WT e C9

Usando análise 2-DE, foram investigadas as mudanças nos perfis proteicos em resposta ao déficit hídrico, inicialmente comparando os mesmos genótipos em diferentes tratamentos (IR-irrigado e NI-não irrigado). Para cada tratamento, foram realizadas triplicatas biológicas, que apresentaram uma alta resolução na separação de *spots*.

Comparando o proteoma do contraste WT IR x WT NI foram detectados 661 *spots*, nas triplicatas de géis 2-DE de ambos os tratamentos, dos quais 48 *spots* foram diferenciais entre os tratamentos. No contraste C9 IR x C9NI foram detectados 548 *spots* no perfil de proteínas, ressaltando apenas 28 *spots* diferenciais. Observando uma diferença de resposta em termos de número de *spots*, que pode ser devido à diferença de tolerância ao estresse.

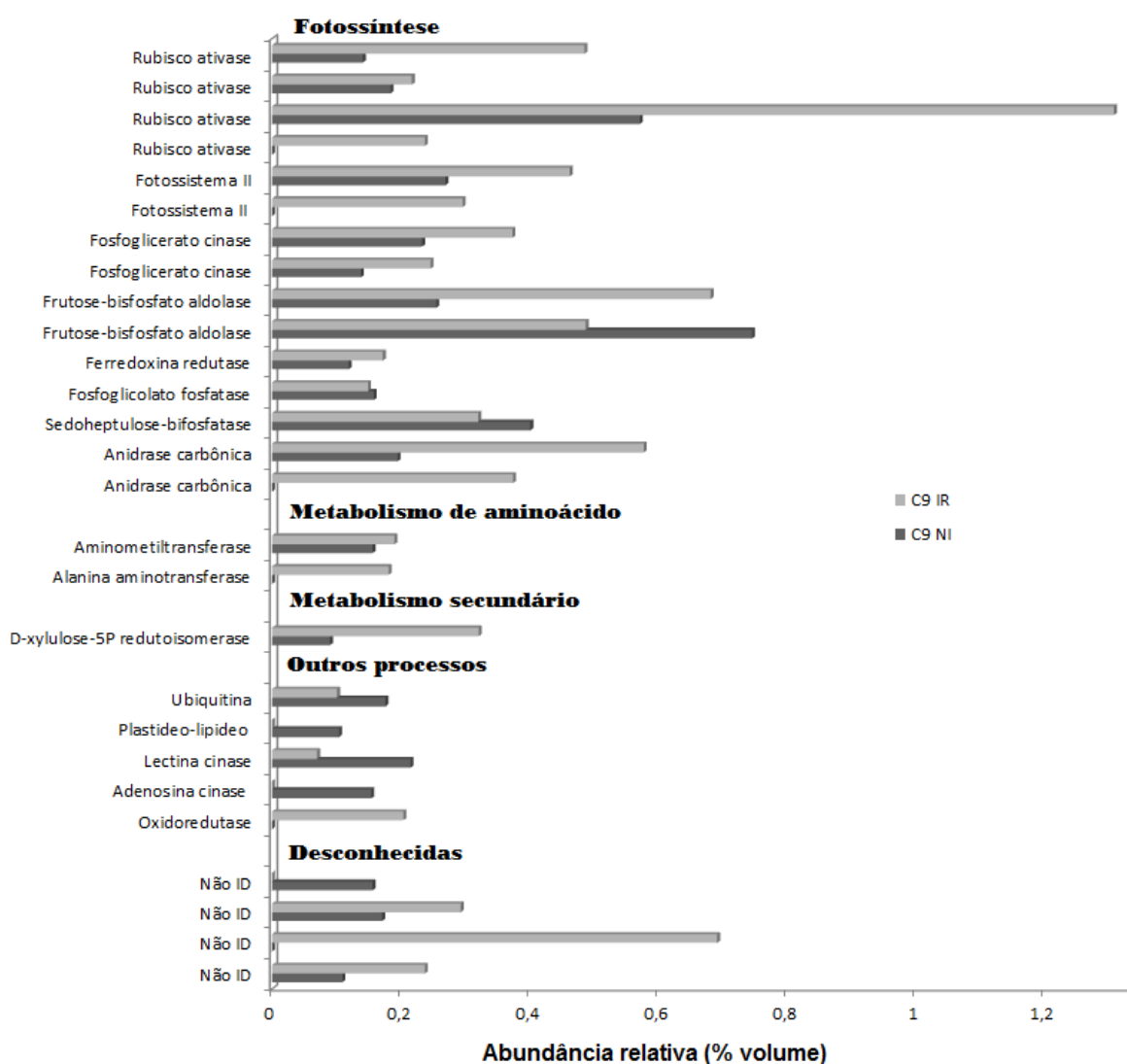
Dos 48 *spots* diferenciais no genótipo WT, identificaram 41 que corresponderam a 29 proteínas, pois foram encontradas isoformas ou modificações pós traducionais de uma mesma proteína, representada por mais de um *spot* no gel (Figura 7). Destas, 22 são relacionados com variação de abundância relativa entre os tratamentos, sendo que houve um aumento com a imposição do déficit em 10 proteínas (duas frutose-bisfosfato aldolase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, chaperonina, superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, aminometiltransferase, diidroflavonol redutase, fator alongação Tu, beta-amilase) e redução em 11 (duas rubisco ativase, rubisco, fotossistema II, duas fosfoglicerato cinase, duas frutose-bisfosfato aldolase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, enolase, glutamato-aminomutase). Duas proteínas foram exclusivas desse genótipo no tratamento irrigado (rubisco e ATP-sintase) e 17 do não irrigado (ferredoxina redutase, triosefosfato isomerase, duas frutose-bisfosfato aldolase, ATP-sintase, álcool desidrogenase, chaperonina, Bip, superóxido dismutase, HSP21, duas fostafase ácida, HCF136, duas lectinas cinase, duas não identificadas).



**Figura 7.** Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais no genótipo WT e sua identificação pelo *PEAKS 7*. Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do Mapman (Banco de dados: Glimax\_109\_peptide).

No Anexo 1, estão representados os *spots* que apresentaram abundância diferencial em folhas de soja do genótipo WT em diferentes tratamentos e que foram identificados por espectrometria de massa. O número da identificação de cada um dos *spots* indicado no gel bidimensional permite a verificação de sua abundância relativa no Anexo 2. Esses resultados indicam, um aumento na abundância relativa de proteínas envolvidas em diferentes processos responsivos a estresse como glicólise, respiração, estresse oxidativo, bem como, uma redução na abundância relativa de proteínas relacionadas à fotossíntese.

A imposição do déficit hídrico no genótipo C9 revelou a presença de 28 *spots* diferenciais, dos quais obtivemos sucesso na identificação de 27, que correspondem a 20 proteínas (Figura 8). Destas 18 são relacionados com variação de abundância relativa entre os tratamentos, sendo que houve aumento em 5 proteínas (frutose bifosfato aldolase, fofoglicolato fosfatase, sedoheptulose bifosfatase, ubiquitina, lectina cinase) e redução em 13 (três rubisco ativase, fotossistema II, duas fosfoglicerato cinase, frutose bifosfato aldolase, ferredoxina redutase, anidrase cabônica, aminometiltransferase, xilose 5P-redutoisomerase, duas não identificadas) com a imposição do estresse. Em adição, 6 proteínas (rubisco ativase, fotossistema II, anidrase cabônica, alanina aminotransferase, oxidoreductase, uma não identificada) foram exclusivos desse genótipo no tratamento irrigado e 3 do não irrigado (lipídio-plastídeo, adenosina cinase e uma não identificada). No Anexo 3, estão representados os *spots* que apresentaram variação na abundância diferencial em folhas de soja do genótipo C9 em diferentes tratamentos e que foram identificadas por espectrometria de massa. O número de identificação de cada um dos *spots* indicado no gel bidimensional permite a verificação de sua abundância relativa no Anexo 4. Diante disso, observamos uma diminuição na abundância relativa da maioria das proteínas envolvidas nos processos de fotossíntese, metabolismo de aminoácido e secundário.

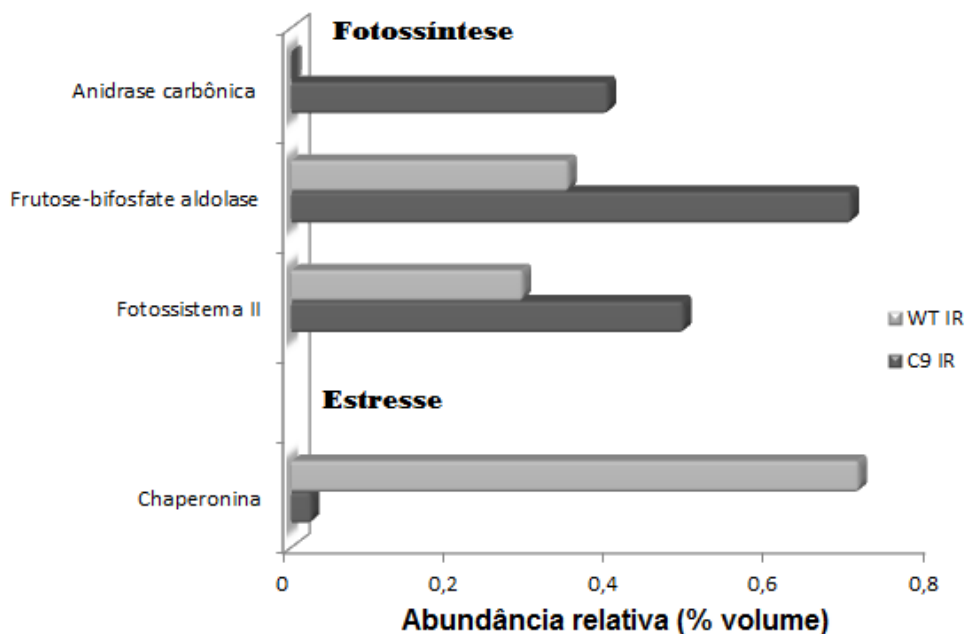


**Figura 8.** Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais no genótipo C9 e sua identificação pelo PEAKS 7. Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do Mapman (Banco de dados: Glimax\_109\_peptide).

### 4.3.2 Proteoma diferencial entre os genótipos WT e C9

Pelo fato do genótipo C9 ser uma planta geneticamente modificada, derivada do cultivar Conquista (WT), com expressão constitutiva de BiP, proteínas com abundância diferencial entre as genótipos poderiam contribuir para a tolerância ao déficit hídrico. Sendo assim, foi realizada a comparação de perfis proteicos entre os genótipos em condições de irrigação e seca.

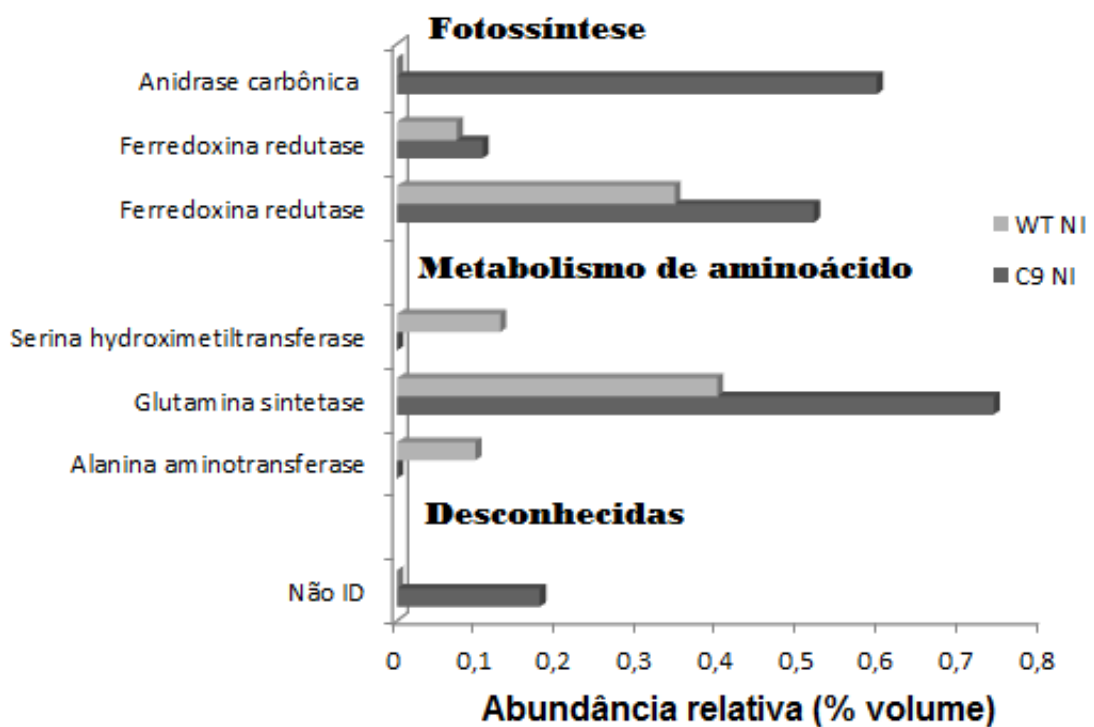
Na comparação entre perfis WT x C9 em condição de irrigação identificamos 4 proteínas com abundância diferencial, sendo que houve maior abundância relativa em 3 proteínas (fotossistema II, frutose-bifosfato aldolase, anidrase carbônica) e redução em 1 (chaperonina). Dessas 4 proteínas, 3 foram classificadas como relacionadas à fotossíntese e uma ao estresse oxidativo (Figura 9). Sendo que, houve maior abundância relativa nas proteínas envolvidas nos processos de fotossíntese e redução nas de estresse oxidativo. A identificação de cada um dos *spots* e a abundância relativa pode ser verificada nos Anexos 5 e 6.



**Figura 9.** Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais entre o genótipo WT e C9 em condições de irrigação e sua identificação pelo PEAKS 7. Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do Mapman (Banco de dados: Glimax\_109\_peptide).

Quando efetuada a comparação entre o perfil WT x C9 submetidos à deficiência hídrica observamos 7 proteínas com abundância diferencial, sendo que houve aumento na abundância relativa de 3 (duas ferredoxina redutase, glutamina sintetase). Uma proteína foi exclusiva do genótipo C9 (anidrase carbônica) e três do WT (alanina aminotransferase, serino hidroximetiltransferase, uma não identificada) (Figura 10). A identificação de

cada um dos *spots* e a abundância relativa pode ser verificada nos Anexos 7 e 8. Dessas 7 proteínas, 3 foram classificadas como relacionadas à fotossíntese, 3 ao metabolismo de aminoácido e uma como desconhecida ou não anotada. Observamos um aumento na abundância relativa das proteínas envolvidas no processo de fotossíntese e ausência de proteínas do metabolismo de aminoácidos no genótipo C9, com exceção da Glutamino sintetase, que teve sua abundância relativa aumentada no genótipo C9.



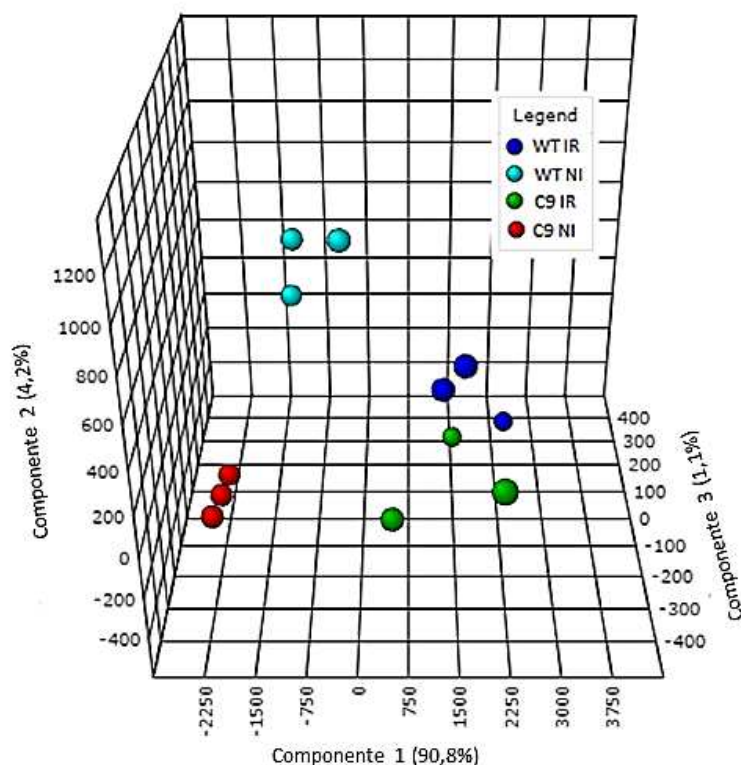
**Figura 10.** Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais entre o genótipo WT e C9 em déficit hídrico e sua identificação pelo PEAKS 7. Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas do Mapman (Banco de dados: Glimax\_109\_peptide).

## 4.4 Metabolômica

### 4.4.1 Perfil metabólico

Para entender quais são as principais mudanças fisiológicas causadas pelo déficit hídrico em soja, também foram analisadas alterações nos metabólitos primários, por GC/MS.

Primeiramente, a tabela de identificação e intensidade dos metabólitos obtida pela biblioteca da Golm Metabolome foi submetida a uma análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), realizada com a finalidade de separação das amostras. Os resultados apresentaram uma tendência de separação entre as amostras em estudo, com uma explicação de 96,1% do total de variância (Figura 11).

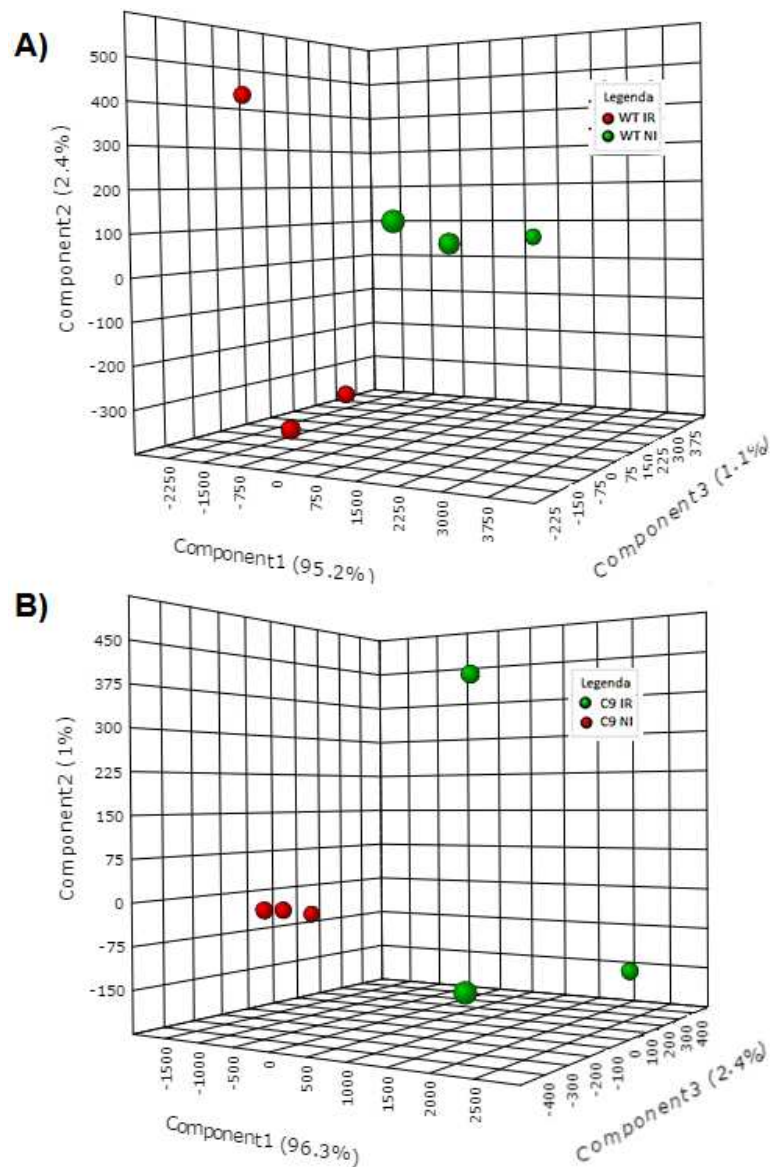


**Figura 11.** Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Análise dos PLS-DA para os diferentes genótipos em condições Irrigadas (IR) e Não Irrigadas (NI), realizada pelo *MetaboAnalyst*.

O perfil metabólico de projeções revelou que os genótipos respondem de forma metabolicamente diferente quando impostos ao déficit hídrico. Diante disso, a importância em se analisar os principais metabólitos alterados em condições de déficit hídrico.

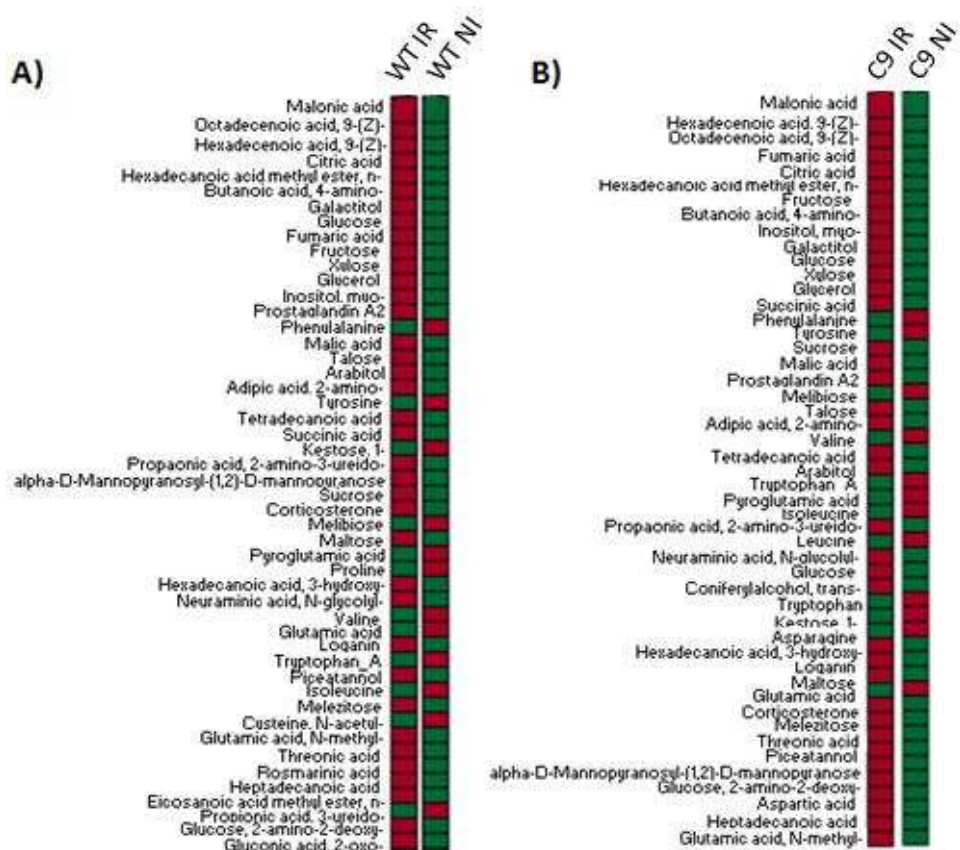
Para isso, foi realizada uma análise de *fold-change* para os genótipos separadamente, considerando metabólitos diferenciais aqueles que o valor de *fold-change* ultrapassasse o *threshold* de 2 e p-valor menor que 0,05. Foram identificados 643 metabólitos para os genótipos por comparação dos espectros das amostras contra aqueles da biblioteca, dos quais 201 foram diferenciais entre o tratamento irrigado e não irrigado no genótipo WT, e 285 no genótipo C9. Os dados foram utilizados para análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), pelo programa *MetaboAnalyst*.

A soma dos valores obtidos para os três primeiros componentes do genótipo WT (C1- 95,2%,C2- 2,4%,C3-1,1%) apresenta uma explicação de 98,7% do total de variância e do genótipo C9 (C1-96,3%,C2- 1,0%, C3-2,4%) uma explicação de 99,7%. Quando comparando esses resultados através do gráfico de 3D scores C1 x C2 x C3 (Figura 12), percebemos uma tendência de separação entre as amostras irrigadas e não irrigadas, para ambos os genótipos.



**Figura 12.** Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Análise dos PLS-DA para os diferentes genótipos em condições Irrigadas (IR) e Não Irrigadas (NI), realizada pelo *MetaboAnalyst*. (A) Genótipos WT e (B) Genótipos C9.

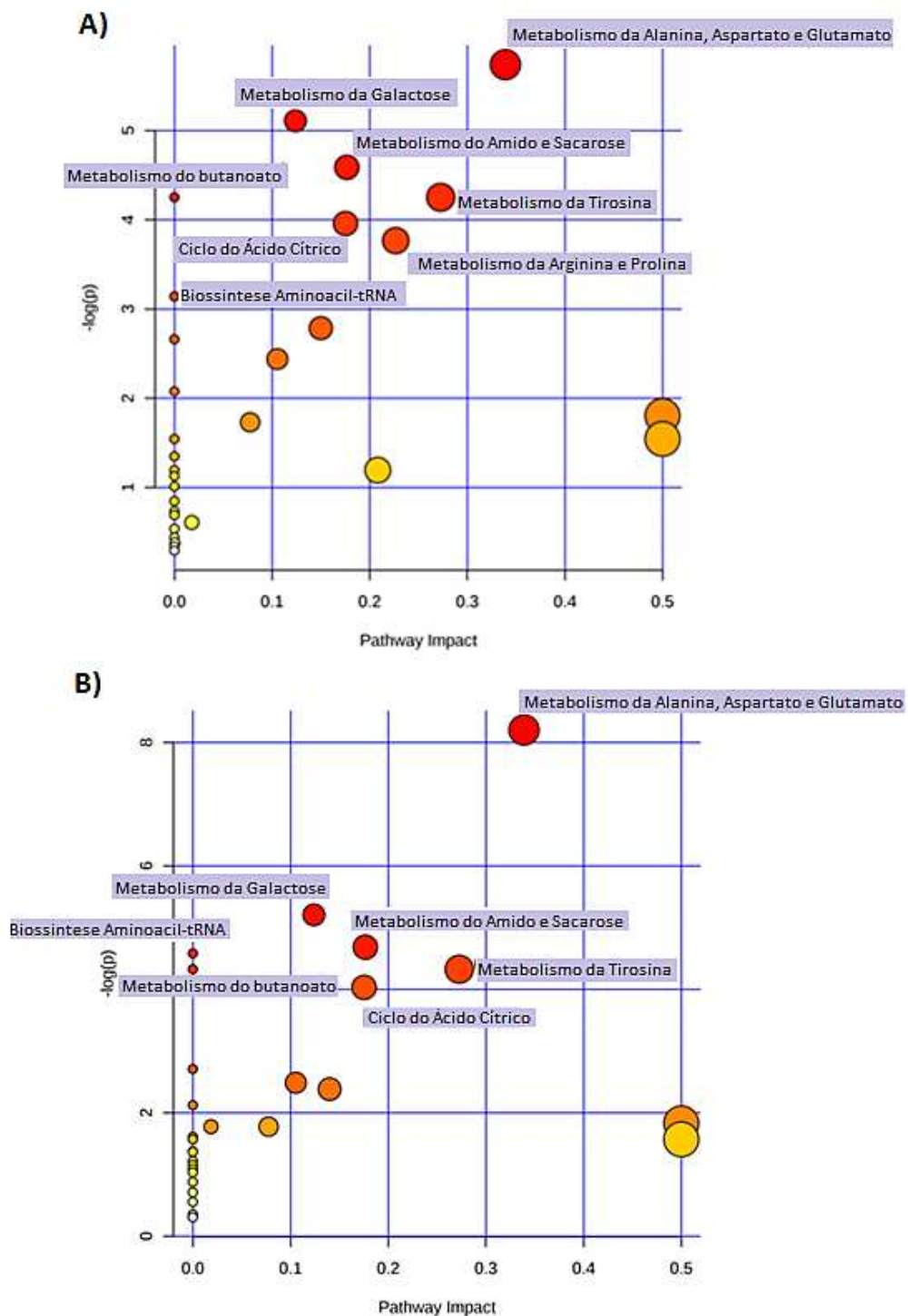
Diante disso, foi realizada a identificação de quais metabólitos têm maior poder discriminatório entre os tratamentos considerando o *escore* VIP (Variáveis Importantes na Projeção) de cada variável. Para investigar as alterações do metabolismo global e avaliar os efeitos do déficit hídrico, 50 variáveis principais para cada genótipo foram selecionadas de acordo com o seu valor do *escore* VIP (Figura 13) e então submetidas à análise de via metabólicas a fim de identificar vias significativamente perturbadas entre os tratamentos.



**Figura 13.** Análise das variáveis importantes na projeção (VIP). Principais metabólitos responsáveis pela discriminação entre grupos de soja irrigada e não irrigada identificados pelo *score* VIP (A) genótipo WT e (B) genótipo C9. Listando em ordem decrescente os metabólitos capazes de distinguir os tratamentos. As cores dos quadrados indicam se a abundância do metabólito esta mais alta (vermelho) ou mais baixa (verde).

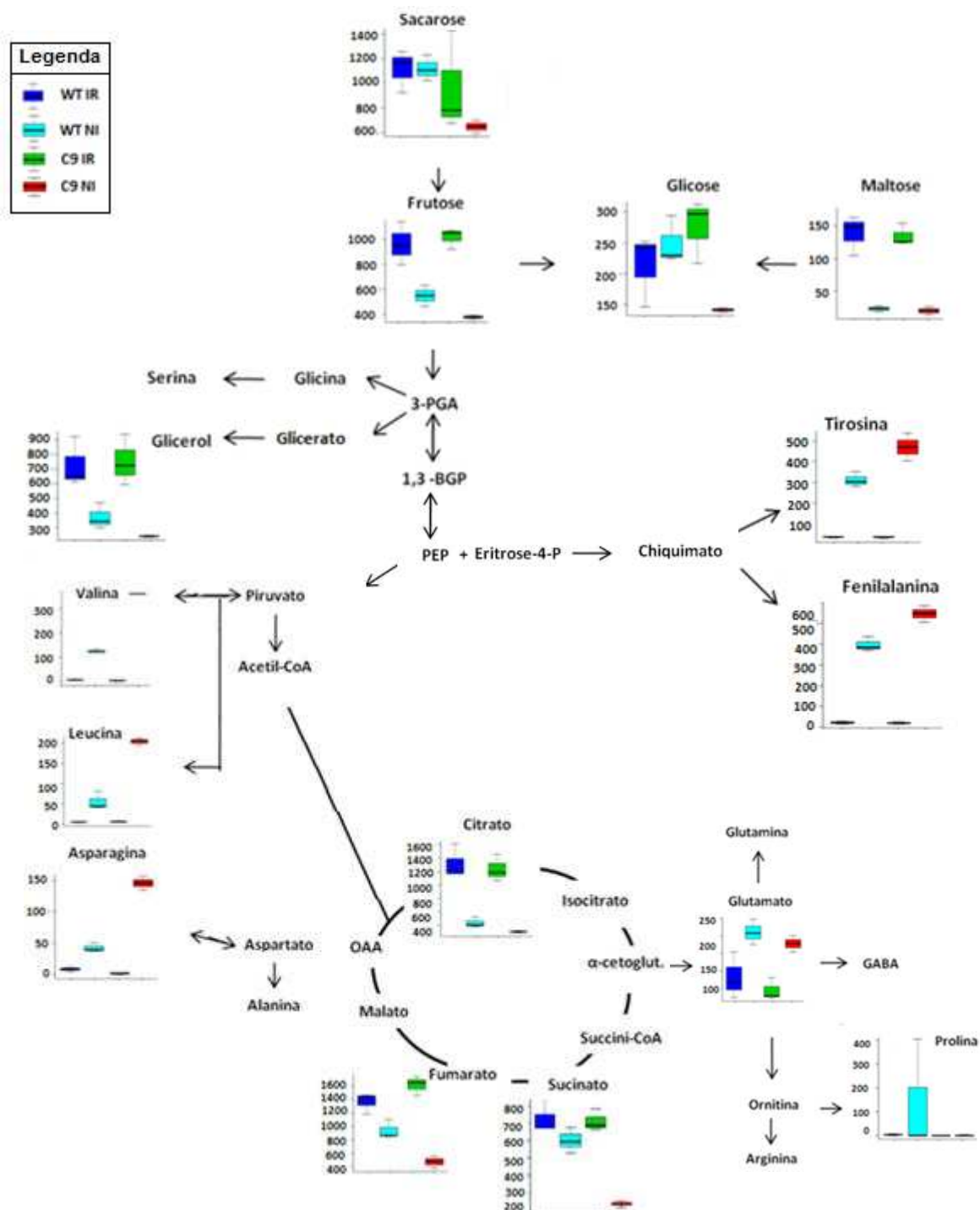
As análises das vias mostraram que oito vias foram significativamente ( $p < 0,05$ ) perturbadas no genótipo WT sob estresse: Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato; Metabolismo de galactose; Metabolismo de amido e sacarose; Metabolismo do butanoato; Metabolismo da tirosina; Ciclo do ácido cítrico (TCA); Metabolismo de arginina e prolina e Biossíntese de t-RNA aminoacil (Figura 14A). No genótipo C9 sete vias foram influenciadas significativamente ( $p < 0,05$ ): Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato; Metabolismo da galactose; Metabolismo de amido e sacarose; Metabolismo

de tirosina; Metabolismo do butanoato; Biossíntese de t-RNA aminoacil e Ciclo do ácido cítrico (TCA) (Figura 14B).



**Figura 14.** Representação esquemática das vias metabólicas significativamente perturbadas após a imposição do déficit hídrico. A análise foi realizada utilizando o *software MetaboAnalyst*. (A) Genótipo WT e (B) genótipo C9. Os percursos combinados dispostos por p-valor estão representados no eixo Y, e valores de impacto da via no eixo X. A cor dos círculos são classificadas de acordo com o p-valor e o tamanho revelam o impacto na via.

Os dados gerados do metabolismo primário foram agrupados na figura 15, para que fosse possível uma melhor compreensão sobre as mudanças ocorridas entre os genótipos na imposição do déficit hídrico.



**Figura 15.** Perfil metabólico de folhas de soja dos dois genótipos sob déficit hídrico. Os metabólitos foram identificados por GC-MS e suas abundâncias expressas em termos de intensidades e normalizados pela mediana, utilizando o programa *MetaboAnalyst*. Os metabólitos com abundâncias diferenciais entre os genótipos foram determinados pelo método VIP.

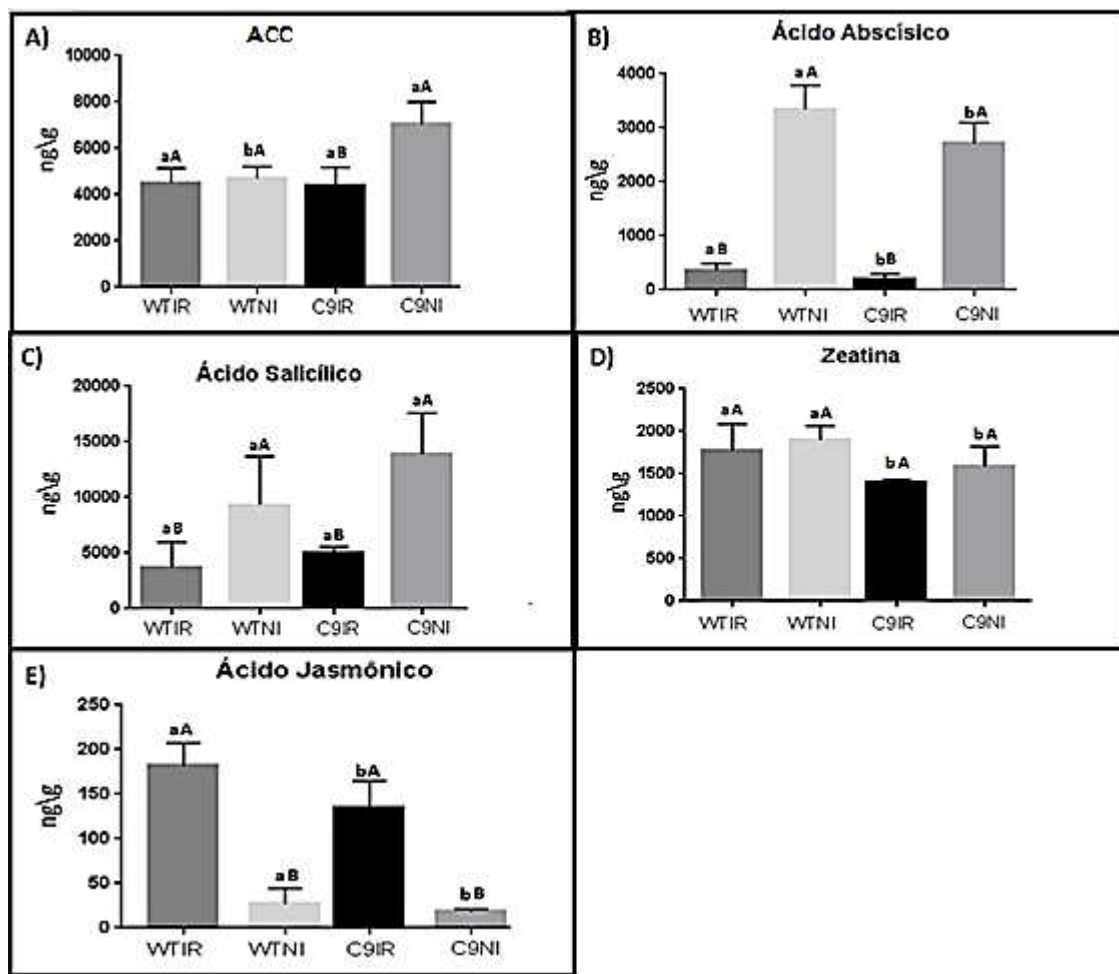
#### 4.4.2 Quantificações de Hormônios

Durante a quantificação foi possível observar que houve um aumento nos hormônios monitorados quando os genótipos foram submetidos ao déficit hídrico, com exceção do ácido jasmônico que observamos uma redução (Figura 16).

A concentração de etileno foi monitorada pelo seu precursor imediato o ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC), sua concentração apresentou incremento significativo de 1,6x vezes com a imposição do déficit hídrico no genótipo C9. Entretanto, no genótipo WT, não houve variação significativa desse hormônio com a imposição do estresse (Figura 16A).

A concentração de ácido abscísico (ABA) e salicílico (SA) nas folhas foram alteradas significativamente quando as plantas foram submetidas à seca. Para o ABA, foi constatado incremento significativo de 13x vezes no genótipo C9 e 9x vezes no WT sob déficit hídrico (Figura 16B). Quando comparando genótipos, WT manteve níveis mais altos de ABA tanto no tratamento irrigado, quanto no estresse. As concentrações de SA apresentaram um incremento significativo de 2x vezes com a imposição déficit hídrico para ambos os genótipos (Figura 16C).

A zeatina, um tipo de citocinina, esteve presente em todas as amostras em análise, havendo alterações significativas apenas entre os genótipos, onde o genótipo WT apresentou maiores níveis desse hormônio (Figura 16D). A concentração de ácido jasmônico (JA) na folha foi significativamente alterada entre os tratamentos, havendo uma redução de 7x vezes sob déficit hídrico no genótipo C9. Já no WT, essa redução foi de 6x vezes (Figura 16E), tendo menores níveis no genótipo C9 sob déficit hídrico.



**Figura 16.** Quantificação dos hormônios (ng/g) (A) Ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC) (B) Ácido Abscísico (C) Ácido Salicílico (D) Zeatina e (E) Ácido Jasmônico em folhas de soja. Os dados representam a média  $\pm$  EP (n=3). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se aos genótipos e maiúsculas aos tratamentos.

## 5. DISCUSSÃO

Em plantas, a tolerância ou sensibilidade ao déficit hídrico depende da espécie e do genótipo em estudo, da duração e severidade do estresse, bem como da fase de desenvolvimento da cultura. Estudos de soja geneticamente modificada superexpressando BiP apresentaram genótipo tolerante ao déficit hídrico (VALENTE *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2014). Também foi observado nesse estudo, por meio da curva de desidratação, que o genótipo

C9 apresentou um retardamento à desidratação. Nos nossos ensaios, as plantas do genótipo WT alcançaram o  $\psi_w = -1,0$  MPa primeiramente, enquanto que o genótipo C9 demandou um tempo maior para atingir os mesmos níveis de  $\psi_w$  (Figura 4). Podemos observar também que sob déficit hídrico o genótipo C9 apresentou características importantes que permitem classificá-lo como relativamente tolerante à seca, como maior teor relativo de água em folhas no  $\psi_w = -1,0$  (Figura 6) o que garante manutenção de turgescência foliar, sendo estes resultados consistentes com uma melhor economia hídrica pelo genótipo C9.

Para melhor entendimento e compreensão dos eventos moleculares envolvidos nas respostas da planta frente à seca, foi realizada análises de proteoma diferencial dos genótipos WT e C9 em diferente disponibilidade hídrica, considerando as variações na abundância relativa das proteínas e suas relações com diferentes processos biológicos. Os resultados apresentaram maior identificação de proteínas relacionadas a processo fotossintético, glicólise, respiração e estresse oxidativo e por isso, as proteínas identificadas nesses processos foram exploradas para uma melhor compreensão dos mecanismos de tolerância do genótipo C9.

Em relação à fotossíntese, ambos os genótipos apresentaram uma redução na abundância relativa, de quase todas, as proteínas identificadas quando a planta foi submetida ao déficit hídrico (Figuras 7 e 8). No entanto, quando comparamos os diferentes genótipos em diferentes tratamentos o genótipo C9 apresentou uma maior abundância de proteínas fotossintéticas tanto em condições irrigadas como não irrigadas (Figuras 9 e 10), podendo essa variação estar relacionado com a tolerância à seca por esse genótipo.

A redução na abundância da rubisco ativase foi detectada em ambos os genótipos sob déficit hídrico (Figura 17A). Esta enzima, 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  $\text{CO}_2$  ocorra no sítio ativo desta proteína, uma função essencial para a fotossíntese (HAMMOND *et al.*, 1998). Períodos de déficit hídrico acarretam redução na condução estomática e subsequente queda nos

níveis de CO<sub>2</sub> no estroma levando a inativação da atividade carboxilase da rubisco pela ligação com açúcares nos sítios ativos (PARKER *et al.*, 2006). O declínio na abundância e atividade da rubisco ativase têm sido associados com a inibição da fotossíntese sob condições de estresses em várias espécies (LAWLOR & TERAZA, 2009; CHAVES *et al.*, 2003).

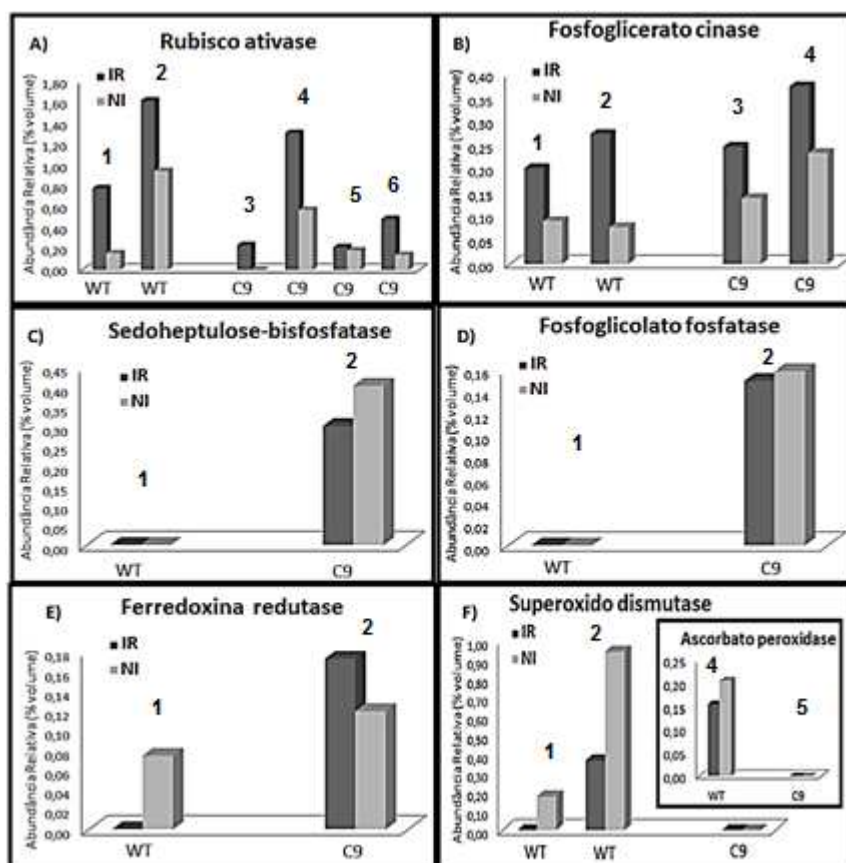
Outra enzima que apresentou redução sob condições de estresse em ambos os genótipos foi fosfoglicerato cinase (Figura 17B) que realiza a primeira etapa do ciclo de Calvin, onde utiliza ATP para fosforilar moléculas de 3-fosfoglicerato e produzir 1,3 bifosfoglicerato. Sua menor abundância quando as plantas estão em condições de déficit hídrico sugere uma inibição do metabolismo energético (CASTILLEJO *et al.*, 2008; NANJO *et al.*, 2010). A redução na abundância dessa enzima foi mais pronunciada no genótipo WT em condições de estresse do que em C9, levando ao surgimento da hipótese de que plantas superexpressando BiP apresentem maior fixação de CO<sub>2</sub> e menor percepção do estresse que plantas WT.

Essa hipótese é sustentada pela detecção da proteína sedoheptulose bisfosfatase, que atua na fase regenerativa da ribulose 1-5 bifosfato do ciclo de Calvin, onde realiza a desfosforilação de sedoheptulose 1,7-bisfosfato formando sedoheptulose-7-fosfato (RAINES *et al.*, 1999). Essa proteína apresentou em plantas do genótipo C9 submetidas a déficit hídrico uma abundância relativa aumentada (Figura 17C), sendo um indicativo da ocorrência, em níveis satisfatórios, do ciclo de Calvin e da fixação de CO<sub>2</sub>. No entanto, se observou um aumento na abundância da fosfoglicolato fosfatase, enzima que converte 2-fosfoglicolato em glicolato, no genótipo C9, sob déficit hídrico, podendo ser indícios de ocorrência de fotorrespiração, que tem o papel importante no consumo de energia (Figura 17D).

Além disso, observou uma redução na abundância de ferredoxina redutase em plantas não irrigadas no genótipo C9 e um aumento no genótipo WT (Figura 17E). A ferredoxina NADP-redutase é uma enzima responsável pela transferência de elétrons da ferredoxina, reduzida pelo fotossistema I, para o NADP<sup>+</sup> (PALATNIK, 1997; VALDERRAMA *et al.*, 2006). O aumento na abundância desta enzima aumenta NADPH<sub>2</sub> (SHIN & ARNON, 1965). Como

grande parte do  $\text{NADPH}_2$  não pode ser consumido, devido à menor assimilação de  $\text{CO}_2$ , no genótipo WT sob déficit hídrico (CARVALHO *et al.*, 2014) começa a haver acúmulo dessa molécula e de ferredoxina reduzida, o que culmina na escassez do receptor final,  $\text{NADP}^+$ . Assim, parte dos elétrons da ferredoxina são usados para reduzir o oxigênio molecular formando superóxidos, que são espécies reativas de oxigênio (ROS) causadoras de peroxidação de lipídeos, danos celulares e inativação de enzimas do ciclo de Calvin (TAMBUSSI *et al.*, 2000). As enzimas superóxido dismutase e ascorbato peroxidase são eficientes eliminadores das ROS o que justifica a presença, com maior abundância, dessas enzimas no genótipo WT submetido ao estresse (Figura 17F), revelando que dados oxidativos estão ocorrendo, resultando na maior expressão dessas proteínas com a finalidade de eliminar essas moléculas danosas a célula. A superóxido dismutase faz parte das metaloproteínas que catalisam a formação do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a partir dos radicais superóxidos. A ascorbato peroxidase catalisa a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  à água tendo papel importante na eliminação desse radical no cloroplasto (TAMBUSSI *et al.*, 2000).

Outra classe de proteínas com abundância aumentada no genótipo WT, sob déficit hídrico, foram as chaperonas e chaperoninas, proteínas induzidas em resposta ativação de vias de sinalização com a função de proteção e dobramento de proteínas recém-sintetizadas, que devido às distintas condições de estresses estão sujeitas à agregação, perdendo a função e causando prejuízos ao organismo. (LIU *et al.*, 2007; SATO & YOKOYA, 2008).



**Figura 17.** Proteínas diferenciais nos genótipos WT e C9 identificação pelo PEAKS 7. Abundância diferencial das diferentes isoformas das enzimas A) Rubisco ativase 1-2/4/6 Beta Rubisco ativase, 3/5 Rubisco ativase. B) Fosfoglicerato cinase 1--4 Fosfoglecerato cinase, piruvato C) Sedoheptulose bifosfatase 1 Ausência da enzima, 2 Sedoheptulose bifosfatase D) Fosfoglicolato fosfatase 1 Ausência da enzima, 2 Fosfoglicolato fosfatase E) ferredoxina redutase 1 Ferredoxina NADP redutase 2 Ferredoxina redutase F) Superóxido dismutase e Ascorbato peroxidase 1 Superóxido dismutase, 2 Iron superóxido dismutase, 3 Ausência da enzima,4 Ascorbato peroxidase, 5 Ausência da enzima.

Em conjunto, esses resultados indicam que plantas superexpressando BiP apresentaram maior tolerância ao estresse, por promover manutenção da homeostase celular, uma vez que não se observou variação em proteínas relacionadas a estresse oxidativo. Carvalho e colaboradores (2014) observaram que o teor de malondialdeído, um produto da peroxidação lipídica associada à senescência, era menor em plantas de genótipo C9, quando comparadas com WT, o reforçando a hipótese acima descrita. Em adição observamos nesse trabalho uma maior abundância de proteínas relacionadas à fotossíntese no genótipo C9 tanto em condições irrigadas como não irrigadas

quando comparado com a isolinha convencional. Esses resultados são condizentes com a literatura, onde trabalhos relatam que plantas de soja superexpressando BiP apresentaram maior assimilação de CO<sub>2</sub> e condutância estomática, por realizarem maiores taxas de transpiração que plantas WT em resposta ao déficit hídrico (VALENTE *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2014).

Outros processos alterados no genótipo WT quando submetido a estresse e não diagnosticado no genótipo C9, e que reforçam a hipótese acima formulada foram à glicólise e respiração (Figura 7). O aumento na abundância de proteínas relacionadas à glicólise como fructose-bisfosfato aldolase e triosefosfato isomerase sob condições de déficit hídrico já foram relatados em estudos e pode refletir a alteração no metabolismo do carbono em resposta à redução da fotossíntese e aumento no ajuste osmótico dos tecidos da folha (UMEDA *et al.*, 1994; SOARES, 2013). Estudos também relatam a maior abundância relativa de enzimas relacionadas à respiração quando plantas são submetidas a déficit hídrico para compensar as baixas taxas de produção de ATP nos cloroplastos sob estresse moderado (FLEXAS *et al.*, 2005; RIBAS-CARBO *et al.*, 2005). Entre elas, está a álcool desidrogenase que participa na interconversão entre álcoois em aldeídos ou cetonas com a redução de uma nicotinamida adenina de nucleotídeo (NAD<sup>+</sup>). O aumento na abundância dessa enzima foi demonstrado em resposta à seca e ácido abscísico (MESQUITA, 2013; HWANG & VAN TOAI, 1991). O ABA promove o aumento da mesma, evidenciando um papel importante desta proteína em resposta a estresse ambientais. A ATP sintase subunidade alfa também apresentou aumento em sua abundância em condições de déficit hídrico, este grupo de proteínas está diretamente envolvido com os mecanismos de síntese energética e o aumento de expressão já foi relatado em estudos de soja submetidos a déficit hídrico (MESQUITA, 2013; SOARES, 2013; BALBI., 2013).

Também foi possível observar uma maior abundância de proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácido no genótipo WT quando comparado com genótipo C9, onde essas proteínas apresentaram abundância diminuída quando submetidos a déficit hídrico. Carvalho e colaboradores (2014) observaram uma menor alteração de genes relacionadas a metabolismo de aminoácido no genótipo C9 do que no WT, quando impostos ao estresse

hídrico ( $\psi W = -1$ ). No entanto, a identificação de poucas proteínas relacionadas a esse processo não é suficiente para evidenciar algo a respeito dessas variações. Assim, para obter um melhor esclarecimento de quais processos moleculares e fisiológicos estão sendo realmente alterados frente ao estresse imposto foi realizado um estudo comparativo dos perfis metabólicos.

Os resultados de perfil metabólico de projeções apresentaram uma tendência de separação das amostras, onde os tratamentos irrigados apresentaram-se próximos, relatando uma maior compatibilidade entre seus metabólitos. Em contradição, os tratamentos submetidos ao déficit hídrico apresentaram uma distribuição espacial bem divergente o que revela que os genótipos respondem de forma metabolicamente diferente quando impostos ao déficit hídrico (Figura 11). Diante disso, os 50 metabólitos com maior poder discriminatório entre os tratamentos, para ambos os genótipos, foram selecionados a fim de identificar as vias metabólicas significativamente perturbadas pela imposição do déficit hídrico (Figura 13). No genótipo WT, as vias metabólicas que tiveram alterações foram: Metabolismo da alanina, aspartato e glutamato; Metabolismo de galactose; Metabolismo de amido e sacarose; Metabolismo do butanoato; Metabolismo da tirosina; Ciclo do ácido cítrico (TCA); Metabolismo de arginina e prolina e Biossíntese de t-RNA aminoacil (Figura 14A). Para o genótipo C9 observou alterações nas mesmas vias metabólicas com exceção da via de Metabolismo de arginina e prolina (Figura 14B). A acumulação de prolina é resultado do decréscimo no potencial osmótico da célula levando a um aumento na síntese de pirrolina-5-carboxilato e, conseqüentemente, a um aumento na síntese de prolina. A acumulação de prolina em células vegetais submetidas a déficit hídrico tem sido sugerida como um mecanismo de ajuste osmótico. Entretanto, alguns autores sugerem outras funções para o acúmulo de prolina, como: estabilizador de estruturas sub-celulares; *scavenger* de radicais livres e componente da cascata de sinalização molecular a estresse (SCHOBERT & TSCHESCHE, 1978; WYN JONES & GORHAM, 1983).

Os dados do perfil metabólico relatam uma redução no teor de açúcares como glicose, sacarose, frutose e maltose no genótipo C9 em comparação ao genótipo WT quando imposto o déficit hídrico. Sabe-se que o aumento do teor

de glicose na célula gera um sinal, mediado ou não pela hexoquinase que promove indução de respiração e diminuição da transcrição de genes fotossintéticos (REDDYA *et al.*, 2004). Esses dados corroboram com os obtidos nas análises proteômicas, onde o genótipo WT, sob imposição de estresse, apresentou uma maior abundância de proteínas relacionadas à respiração e glicólise e menor abundância de proteínas fotossintéticas. Estudos relatam que em soja, além da glicose, os principais solutos acumulados em déficit hídrico são a frutose e a sacarose (MEYER & BOYER, 1981). Esses açúcares apresentaram maiores níveis no genótipo WT quando submetidos ao estresse que no genótipo C9. A redução nos níveis de frutose em ambos os genótipos impostos ao estresse pode estar relacionada ao maior consumo da mesma para biossíntese de sacarose e glicose. Valente e colaboradores (2009) observaram que quando as plantas transgênicas superexpressando BiP foram submetidas ao estresse não houve variação significativa nos níveis de prolina e nem de açúcares, como glicose e sacarose. Esses resultados indicam que, no genótipo C9, a manutenção do potencial hídrico e o turgor de suas células, quando submetidas ao estresse, não são ocasionados pelo acúmulo dessas moléculas.

Embora a seca diminua os teores de açúcares no genótipo C9 sob estresse, observa-se um aumento significativo na maioria dos aminoácidos, com exceção da prolina. O fato dos maiores níveis de aminoácidos ocorrerem no genótipo C9 sustenta a hipótese de que sejam eles os principais contribuintes na redução da desidratação celular por meio do ajuste osmótico e manutenção da homeostase celular. O aumento do nível de aminoácidos livres pode ser em decorrência da elevada síntese de aminoácidos observada em plantas sob déficit hídrico para ajustar o metabolismo, sendo utilizados para a síntese de enzimas ou proteínas específicas envolvidas na tolerância ou atuarem como osmoprotetores contra a desidratação (STEWART & LARHER, 1980; NAVARILIZZO *et al.*, 1990; NAMBARA *et al.*, 1998).

A seca influencia também a expressão de vários genes envolvidos na síntese, distribuição e sinalização de hormônios e por isso a importância em se avaliar alterações hormonais, uma vez que estes apresentam respostas rápidas frente a alterações ambientais. Durante as análises quantitativas

observamos um aumento nos níveis da maioria dos hormônios monitorados quanto à planta foi submetida ao déficit hídrico.

O ABA tem sido o hormônio mais estudado na resposta a estresse abiótico, sendo que sua síntese representa a resposta mais rápida à seca e dispara a expressão de genes responsivos (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2006). ABA evita a transpiração excessiva pelo fechamento estomático e a consequente redução da perda de água (WILKINSON & DAVIES, 2010). A resposta à seca é claramente relacionada ao aumento nos níveis de ABA em folhas de ambos os genótipos, com variação significativa entre os genótipos (Figura 16B). A maior concentração de ABA no genótipo WT pode estar relacionada com a menor assimilação de CO<sub>2</sub> por esse genótipo em resposta ao fechamento estomático. Além disso, acúmulo de valina, arginina e leucina foram observados em plantas com grande quantidade de ABA, evidenciando uma íntima relação entre esse hormônio e o acúmulo de aminoácidos (UMEZAWA *et al.*, 2006; WILKINSON & DAVIES, 2010; ASBAHI, 2012). Diante disso, o maior acúmulo de aminoácidos no genótipo C9 submetido ao déficit hídrico parece ser o responsável pela manutenção do turgor celular, preservando processos como condutância estomática, taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, expansão dos tecidos e integridade das células para as atividades vitais (BARTELS & SUNKAR, 2005; CARVALHO *et al.*, 2014).

Outro hormônio envolvido na indução de tolerância aos diferentes tipos de estresses é o ácido salicílico, que apresentou um aumento significativo durante a seca em ambos os genótipos, apresentando maiores níveis no genótipo C9 (Figura 16C). Esses dados estão de acordo com resultados obtidos por Carvalho e colaboradores (2014) que relataram que a superexpressão de BiP estimula a ativação de genes responsivos ao SA e encontrou-se maiores níveis desse hormônio em plantas geneticamente modificadas, mesmo em condições normais. Estudos têm indicado considerável importância à habilidade do SA em induzir efeitos de proteção em plantas sob estresse por elevar ou regular a atividade de enzimas de desintoxicação celular (AZOOZ & YOUSSEF, 2010., KERBAUY, 2008). Geralmente, a exposição ao déficit hídrico diminui os níveis de citocininas e aumenta os níveis de etileno (COWAN *et al.*, 1999). No entanto, no presente estudo não se observou variações significativa nos níveis

de zeatina, uma citocinina, em ambos genótipos submetidos à seca (Figura 16D). Já o etileno apresentou maiores níveis no genótipo C9 em condições de estresse que o WT (Figura 16A).

A senescência foliar também pode ser induzida por ácido jasmônico em várias espécies vegetais ocasionada pelo decréscimo do conteúdo de clorofila, pelo aumento na respiração e proteólise (WEIDHASE *et al.*, 1987). No entanto, no presente estudo esse hormônio apresentou menores níveis quando submetido ao estresse para ambos os genótipos (Figura 16E). Isso pode estar relacionado a um maior acúmulo SA que pode promover efeito antagonista na sinalização de JA. Estudo recente relatou que vários genes envolvidos na síntese de JA foram regulados negativamente em genótipos superexpressão BiP, o que justifica a redução desse hormônio no genótipo C9 (CARVALHO *et al.*, 2014).

## 6. CONCLUSÃO

Plantas superexpressando BiP apresentaram, mesmo em baixas condições de irrigação, uma maior abundância de proteínas relacionadas à fotossíntese, o que sustenta a hipótese que estas plantas estão predispostas geneticamente e fisiologicamente a suportar períodos de seca. Ao contrário do genótipo selvagem, plantas transgênicas não apresentaram mudanças significativas em proteínas relacionadas à glicólise, respiração e estresse oxidativo, o que evidencia uma menor percepção do estresse pelo genótipo engenheirado.

O acúmulo intracelular de solutos osmoticamente ativos em consequência ao déficit hídrico pode ser um importante mecanismo de ajuste adotado pelas plantas superexpressando BiP. Como evidenciado pelos perfis metabólicos, o acúmulo de aminoácidos pode ser o mecanismo responsável pela manutenção da turgescência celular no genótipo transgênico. Este mecanismo protetor pode possibilitar que a fotossíntese e outras atividades fisiológicas sejam mais operantes em condições de seca.

Em condições de déficit hídrico, o ácido salicílico parece ter considerável importância em induzir efeitos de proteção na planta transgênica, podendo estar relacionado a metabolismos antioxidativo e na atenuação da senescência celular por sua possível ação antagonista ao ácido jasmônico. No entanto, o mecanismo exato do modo de ação do ácido salicílico ainda não é muito bem compreendido.

## 7. REFERÊNCIAS

ABDELNUR, P. V., EBERLIN, L. S., DE SA, G. F., SOUZA, V., EBERLIN, M. N. Single-Shot biodiesel analysis: Nearly instantaneous typification and quality control solely by ambient mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 80, p. 7882-7886, 2008.

AEBERSOLD, R., MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 42, p. 198-207, 2003.

ALONSO, M. J., ECKER, J. R. The ethylene pathway: a paradigm for plant hormone signaling and interaction. **Sci. STKE**, n. 70, p. 1-10, 2007.

ALVIM, F. C., CAROLINO, S. M. B., CASCARDO, J. C. M., NUNES, C. C., MARTINEZ, C. A., OTONI, W. C., FONTES, E. P. B. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. **Plant Physiology**, v.126, p.1042-1054, 2001.

ASBAHI, A. A. A., MAQTARI, M. A. A., KHALID, M. N: ABA biosynthesis defective mutants reduce some free amino acids accumulation under drought stress in tomato leaves in comparison with *Arabidopsis* plants tissues. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v. 8, p. 179-192, 2012.

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

AZOOZ, M. M.; YOUSSEF, M. M. Evaluation of heat shock and salicylic acid treatments as inducers of drought stress tolerance in hassawi wheat. **American Journal of Plant Physiology**, v. 5, n. 2, p. 56-70, 2010.

BADAWI, G., YAMAUCHI, Y., KAWANO, N., TANAKA, K., TANAKA, K. Enhanced tolerance to water deficit and high salt stress by overexpressing superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, p.S230-S230, 2004.

BALBI, B. P. **Análise Do Proteoma e do Fosfoproteoma Diferencial de Soja (*Glycine Max (L.) Merrill*) em Resposta ao Estresse Hídrico.** Universidade Federal de Viçosa. 2013. (Dissertação, Doutorado em Genética e Melhoramento).

BARNABÁS, B., JAGER, K., FEHÉR, A. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.31, p. 11- 38, 2008.

BARTELS, D., SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 24, n. 1, p. 23-58, 2005.

BEDAIR, M., SUMMER, L. W. Current and emerging massspectrometry technologies for metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 27, p. 238-250, 2008.

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

BERTOLOTTI, A., ZHANG, Y. H., HENDERSHOT, L. M., HARDING, H. P., RON, D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. **Nature Cell Biology**, v. 2, p. 326-332, 2000.

BOHNERT, H.J., NELSON, D. E., JENSEN, R.G. Adaptation to environmental stresses. **PlantCell.Baltimore**, v.7, p. 1099-1111, 1995.

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

BRAY, E. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 407, 2004.

BROSSA, R., LÓPEZ-CARBONELL, M., JUBANY-MARÍ, T., ALEGRE, L. Interplay between abscisic acid and jasmonic acid and its role in wateroxidative stress in wild-type, ABA-deficient, JA-deficient, and ascorbate-deficient *Arabidopsis* plants. **Journal of Plant Growth Regulator**, v. 30, p. 322-333, 2011.

CARVALHO, H. H., BRUSTOLINI, O, J. B., PIMENTA, R. P., MENDES, G. C., GOUVEIA, B. C., SILVA, P. A., SILVA, J. C. F., MOTA, C. S., RAMOS, J. R. L. S, FONTES, E. P. B. The Molecular Chaperone Binding Protein BiP Prevents Leaf Dehydration-Induced Cellular Homeostasis Disruption. **PLoS ONE**, v.9, p. e.86661, 2014.

CARVALHO, H. H., SILVA, P. A., MENDES, G. C., BRUSTOLINI, O. J. B., PIMENTA, M. R., GOUVEIA, B. C., VALENTE, M. A. S., RAMOS, H. J. O., Soares-Ramos, J. R. L., Fontes, E. P. B. The Endoplasmic Reticulum Binding Protein BiP Displays Dual Function in Modulating Cell Death Events. **Plant Physiology**, v. 164, p. 654-670, 2014.

CASCARDO, J. C. M., BUZELI, R. A. A. , ALMEIDA, R. S. , OTONI, W. C., FONTES, E.P.B. Differential expression of the soybean BiP gene family.**Plant Science** , Elsevier Science Ireland Ltda, v. 160, n. 2, p. 273-281, 2001.

CASTILLEJO, M. A., MALDONADO, A. M, OGUETA, S., JORRÍN, J. V. 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.

CASTRO, P. R. C., VIEIRA, E. L. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.2, p.222-228, 2001.

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

CHUNG, G., SINGH, R. J. Broadening the genetic base of soybean: a multidisciplinary approach. **Critical Reviews in Plant sciences**, Boca Raton, v.27, n. 5, p. 295-341, 2008.

COLLI, S. Outros reguladores: brassinosteróides, poliaminas, ácidos jasmônico e salicílico. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, p. 296-302, 2008.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014. Acompanhamento da safra 2013/2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>. Acesso em: 10 Abr. 2014.

COWAN, A. K., CAIRNS, A. L. P., BARTELS-RAHM, B. Regulation of abscisic acid metabolism: towards a metabolic basis for abscisic acid-cytokinin antagonism. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 595–603, 1999.

CUADROS-INOSTROZA, A., CALDANA, C., REDESTIG, H., KUSANO, M., LISEC, J., PEÑA-CORTÉS, H., WILLMITZER, L., HANNAH, M. A. TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics**, v.10, p. 428, 2009.

DALL'AGNOL, A., LAZAROTTO, J. J., HIRAKURI, M. H. Desenvolvimento, Mercado e Rentabilidade da Soja Brasileira. Paraná: **Embrapa Soja**, p. 20, 2010. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 74).

DAIE, J., CAMPBELL, W. F. Response of tomato plants to stressful temperatures. Increase in abscisic acid concentrations. **Plant Physiology**, v. 67, p. 26-29, 1981.

DIXON, R. A., GANG, D. R., CHARLTON, A. J., FIEHN, O., KUIPER, H. A., REYNOLDS, T. L, TJEERDEMA, R. S, JEFFERY, E. H, GERMAN, J. B, RIDLEY, W. P, SEIBER, J. N. Applications of metabolomics in agriculture. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.54, p. 8984-8994, 2006.

DOMBROWSKI, J. E. Salt Stress Activation of Wound-Related Genes in Tomato Plants. **Plant Physiology**, v. 132, p. 2098–2107, 2003.

FIEHN, O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 155-171, 2002.

FIETTO, L. G.,\*COSTA, D. L. M., CRUZ, C. D., SOUZA, A. A., MACHADO, M. A., FONTES, E. P. B. ; (\* EQUAL CONTRIBUTION). Identification and in silico analysis of the Citrus HSP70 molecular chaperone gene family. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 881-887, 2007.

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, p. 85–94, 2005.

FLYNN, G. C., CHAPPELL, T. G., ROTHMAN, J. E. Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. **Science**, v. 245, p. 385-390, 1989.

GAO, X. P., WANG , X. F., LU, Y. F., ZHANG, L. Y., SHEN, Y. Y., LIANG, Z., ZHANG, D. P. Jasmonic acid is involved in the water-stress-induced betaine accumulation in pear leaves. **Plant, Cell & Environment**, v. 27, p. 497-507, 2004.

GOMES, C. G. **Determinação das vendas de fertilizantes para a soja no Brasil de 1988 a 2012**. São Paulo: Fundação Getúlio Vargas 2014. 56 p. (Dissertação, Mestrado em Economia e Gestão do Agronegócio).

GONZÁLEZ-FERNANDES, R., PRATS, E., JORRÍN-NOVO, J. V. Proteomics of plant pathogenic fungi. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p.36, 2010.

GORG, A., WEISS, W., DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.

GUPTA, A. S., HEINEN, J. L., HOLADAY, A. S., BURKE, J. J., ALLEN, R. D. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. **Proc Natl Acad Sci USA** , v. 90, p.1629–1633, 1993.

HAMMOND, E. T., ANDREWS, T. J., MOTT, K. A., WOODROW, I. E. Regulation of Rubisco activation in antisense plants of tobacco containing reduced levels of Rubisco activase. **Plant Journal**, v. 14, p. 100-110, 1998.

HAN, J., WANG, Y. Proteomics: present and future in food science and technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 26-30, 2008.

HASEGAWA P. M., BRESSAN, R.A., ZHU, J. K., BOHNERT, H.J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual **Review of Plant Physiology and Plant Molecular**, v. 51 p. 463-499, 2000.

HIRAKURI, M. H., LAZZAROTTO, J. J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro . **Embrapa Soja**, Londrina:, 2014.

HSIEH, T. H., LEE, J. T., CHARNG, Y. Y., CHAN, M. T. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. **Plant Physiol**, v.130, p. 618-626, 2002.

HU, H., DAI, M., YAO, J., XIAO, B., LI, X., ZHANG, Q., XIONG, L. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 12987–12992, 2006.

HWANG, S. Y., VAN-TOAI, T. T. Abscisic Acid induces anaerobiosis tolerance in corn. **Plant Physiology**, v. 97, p. 593–597, 1991.

ISODA, A., WANG, P. Leaf temperature and transpiration of field-grown cotton and soybean under arid and humid conditions. **Plant Production Science**, Tokyo, v. 5, p. 224-228, 2002.

JAGLO-OTTOSEN, K. R., GILMOUR, S. J., ZARKA, D. G., SCHABENBERGER, O., THOMASHOW, M. F. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. **Science**, v. 280, p. 104-106, 1998.

JORRÍN-NOVO, J. V., MALDONADO, A. M., ECHEVARRÍA-ZOMEÑO, S., VALLEDOR, L., CASTILLEJO, M. A., CURTO, M., VALERO, J., SGHAIER, B., DONOOSO, G., REDONDO, I. Plant proteomics update (2007-2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 285-314, 2009.

MAHOUACHI, J., ARBONA, V., GÓMEZ-CADENAS, A. Hormonal changes in papaya seedlings subjected to progressive water stress and re-watering. **Journal of Plant Growth Regulator**, v. 53, p. 43–51, 2007.

KASUGA, M., LIU, Q., SETSUKO, M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Natural Biotechnology**, v. 17, p. 287-291, 1999.

KALINSKI, A., ROWLEY, D.L., LOER, D.S., FOLEY, C., BUTA, G., HERMAN, E. M. Binding-protein expression is subject to temporal, developmental and stress-induced regulation in terminally differentiated soybean organs. **Planta**, v.195, p. 611–621, 1995.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Guanabara Koogan, 2.edição, 431 p., 2008.

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

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RIMA, p. 531, 2000.

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.

LEBORGNE-CASTEL, N., JELITTO-VAN DOOREN, E. P. W. M., CROFTS, A. J., DENECKE J. Overexpression of BiP in tobacco alleviates endoplasmic reticulum stress. **The Plant Cell**, v.11, p. 459–470, 1999.

LEI, Z., HUHMANN, D. V., SUMMER, L. W. Mass spectrometry strategies in metabolomics. **J Biol Chem**, v. 286(29), p. 35-42, 2011.

LICHTENTHALER, H. K. The stress concept in plants: an introduction. **Annals New York Academy of Science**, p. 187-198, 2006.

LISAR, S. Y. S., MOTAFAKKERAZAD, R., HOSSAIN, M. M., RAHMAN, I. M. M. Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses. In: Rahman, I. M. M. & Hasegawa, H. Water Stress, **InTech**, Croatia, p. 01-14, 2012.

LIU, J., SRIVASTAVA, R., CHE, P., HOWELL, S. H. 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.

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

MARTÍN, F. J. P. **Respuestas inducidas por ácido abscísico y ácido salicílico en las simbiosis de judía y alfalfa en estrés salino**. Granada: Faculdade de Ciências, Universidade de Granada. 2009. 395 p. (Dissertação, Doutorado em Ciências Biológicas).

MATTICK, J.S. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. **Bio Essays**, v.25, p.930-939, 2003.

McKAY, D. B. Structure and mechanism of 70-kDa heat-shock-related proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 44, p. 67-80, 1993.

MESQUITA, R. O. **Determinantes fisiológicos e moleculares da resposta diferencial à seca em soja**. Viçosa Universidade Federal de Viçosa. 2013. (Dissertação, Doutorado em Fisiologia Vegetal).

MEYER, R.F., BOYER, J. S. Osmoregulation, solute distribution, and growth in soybean seedlings having low water potentials. **Planta**, v.151, p.482-489, 1981.

MISSÃO, M.R. Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Revista de Ciências Empresarias**, Umuarama, v.3, n.1, 7-15, 2006.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 11, n. 1, p. 15-19, Jan. 2006.

MONTANS, F. M. **Inoculação e aplicação de regulador vegetal na cultura do amendoim cultivado em dois solos de diferentes texturas**. Universidade de Marília, São Paulo. 2007. 55p. (Dissertação, Mestrado em Fitotecnia).

NANJO, Y., SKULTETY, L., ASHRAF, Y., KOMATSU, S. 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.

NAMBARA, E., KAWAIDE, H., KAMIYA, Y., NAITO, S. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant that has a defect in ABA accumulation: ABA dependent and ABA-independent accumulation of free amino acids during dehydration. **Plant Cell Physiol**, v. 39, p. 853–858, 1998.

NAVARI-IZZO, F., QUARTACCI, M. F., IZZO, R. Water-stress induced changes in protein and free amino acids in field grown maize and sunflower. **Plant Physiol Biochem**, v. 28, p. 531-537, 1990.

NGUYEN, T.H., LAW, D.T.S., WILLIAMS, D.B. Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of the Sciences**, v.88, p. 1565-1569, 1991.

OLIVER, S. G., WINSON, M. K., KELL, D. B., BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 373-378, 1998.

OLLAS, C., ARBONA, V., CADENAS, A. G. Jasmonic acid interacts with abscisic acid to regulate plant responses to water stress conditions. **Plant Signaling & Behavior**, v.10, e1078953, 2015.

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.

PARKER, R., FLOWERS, T. J, MOORE, A. L., HARPHAM, N. V. 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.

PICOLI, E. A. T. ; FIGUEIRA, M. L. ; OTONI, W. C. ; CAROLINO, S. M. B. ; ALMEIDA, R. S. ; SILVA, E. A. M.;CARVALHO, C. R. ; FONTES, E.P.B. Hyperhydricity *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein).**Plant Science** , Elsevier Science Ireland Ltd, v. 160, p. 857-868, 2001.

PINTO, A. C., SILVA, D. H. S. , BOLZANI, V. D. A. S., LOPES, N. P., EPIFANIO, R. D. E. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Quim.Nova.** , v. 25(1), p. 45-61, 2002.

RAINES, C. A., LLOYD. C., WILLINGHAM, N. M., POTTS, S., DYER, T. A. cDNA and gene-Sequences of Wheat Chloroplast Sedoheptulose-1,7-Biphosphatase Reveal Homology with Fructose-1,6-Biphosphatase. **European Journal of Biochemistry**, v. 205, p.1053-1059, 1992.

RAMOS, M. L. G.; PARSONS, R., SPRENT, J. I. Differences in ureide and amino acid content of water stressed soybean inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Goiânia, v.40, p.453-458, 2005.

REDDYA, A. R., CHAITANYAA, K. V., VIVEKANANDANB, M.Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v.161, p.1189-1202, 2004.

REIS, P. A. B., FONTES, E. P. B. N-rica proteína (NRP) mediada sinalização morte celular: um novo ramo da resposta ao estresse ER com implicações para a biotecnologia vegetal.**Planta de sinal Behav**, v. 7, p. 628-632, 2012.

REIS, P. A. B., ROSADO, G. L., SILVA, L. A., OLIVEIRA, L. C., OLIVEIRA, L. B., COSTA, M. D., ALVIM, F. C., FONTES, E. P. B. The binding protein BiP attenuates stress-induced cell death in soybean via modulation of the N-rich protein-mediated signaling pathway.**Plant Physiol**, v.157, p.1853-1865, 2011.

RIBAS-CARBO, M., TAYLOR, L. N., 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**, v. 139, p.466-473, 2005.

RODRIGUES, F. A.; LAIA, M. L.; ZINGARETTI, S. M. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. **Plant Science**, v. 176, p. 286-302, 2009.

RODRIGUES, S. M., ANDRADE, M. O., GOMES, A. P. S., DAMATTA, F. M., BARACAT-PEREIRA, M. C., FONTES, E. P. B. *Arabidopsis* and *tobacco* plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 57, p. 1909–1918, 2006.

RODRIGUES, M. V. N., REHDER, V. L. G., SARTORATTO, A., JÚNIOR, S. B., SANTOS, A. S. **O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais**. Universidade Estadual de Campinas CPQBA-UNICAMP, 2006.

RONDE, J. A., LAURIE, R. N., CAETANO, T., GREYLING, M. M., KEREPESI, I. Comparative study between transgenic and non-transgenic soybean lines proved transgenic lines to be more drought tolerant. **Euphytica**, Wageningen, v. 138, p.123-132, 2004.

RUPESH, D., HUMIRA, S., GUNVANT, P., WEI, S., SILVAS, P., RAYMOND, M., TRI VUONG., BABU, V., HENRY, T. N. Integrando abordagens para tolerância a estresse abiótico em soja. **Sci Plant**, v. 5, p.244, 2014.

SANDERS, S.L., WHITFIELD, K.M., VOGEL, J.P. Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. **Cell.**, v. 69, p. 353-365, 1992.

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.

SCHOBERT, B., TSCHESCHE, H. Unusual solution properties of proline and its interactions with proteins. **Biochem. Biophys. Acta**, v.541, p.270-277, 1978.

SCHOLANDER, P.E., HAMMEL, H.T., BRADSTREET, E.D., HEMMINGSEN, E.A. Sap pressure in vascular plants. **Science**, Washington, v.148, p.339-46, 1965.

SCHRÖDER, M., KAUFMAN, R. J. ER stress and the unfolded protein response. **Mutation Research**, v. 569, p. 29-63, 2005.

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 Expression and Signal Transduction in Water-Stress **Response.Plant Physiology**, v. 115, p. 327-334, 1997.

SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K: Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 217-223, 2000.

SILVA, M. A., JIFON, J. L., SILVA, J. A. G., SHARMA, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v..19, p. 193-201, 2007.

SILVA, P. A., SILVA, J. C. F. , CAETANO, H. D. N., MACHADO, J. P. B., MENDES, G. C., REIS, P. A. B., BRUSTOLINI, O. J. B., DAL-BIANCO, M., FONTES, E. P. B. Comprehensive analysis of the endoplasmic reticulum stress response in the soybean genome: conserved and plant-specific features. **BMC Genomics**, v. 16, p. 783, 2015.

SINCLAIR, T. R., RUFTY, T. W. Nitrogen and water resources commonly limit crop yield increases, not necessarily plant genetics. **Global Food Security**, v.1, n. 2, p. 94-98, 2012.

SOARES, C. K.G. **Efeito do Estresse Hídrico na Expressão de Proteínas em duas Variedades De Soja Contrastantes Para o Conteúdo de Óleo e Proteína**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2013. (Dissertação, Doutorado em Bioquímica Agrícola).

SRIDHAR, J., EITEMAN, M.A., WIEGEL, J. W. Elucidation of enzymes in fermentation pathways used by *Clostridium thermosuccinogenes* growing on inulin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 246–251, 2000.

STEWART, G. R., LARHER, F. Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. In **"The Biochemistry of Plants" (BJ Mifflin ed)**, vol. 5, Academic Press, New York, p. 609-635, 1980.

UMEDA, M., HARA, C., MATSUBAYASHI, Y., LI, H.H., LIU, Q., TADOKORO, F., AOTSUKA, S., UCHIMIYA, H. Expressed sequence tags from cultured cells of rice 106 (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of genes engaged in ATPgenerating pathways. **Plant Molecular Biology**, v. 25, p. 469–478, 1994.

UMEZAWA, T., FUJITA, M., FUJITA, Y.,YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Curr. Opin.Biotech**, v. 17, p. 113-122, 2006.

URADE, R. Cellular response to unfolded proteins in the endoplasmic reticulum of plants.**FEBS Journal**. V. 274, p. 1152-1171, 2007.

VALDERRAMA, CORPAS, F. J., CARRERAS, A., GÓMEZ-RODRÍGUEZ, M. V., CHAKI, M., PEDRAJAS, J. R., FERNÁNDEZ-OCAÑA, A., DEL RÍO, L. A., BARROSO, J. B. 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.

VALENTE, M. A. S., FARIA J. A. Q. A., RAMOS J. R. L. S., REIS, P. A. B., PINHEIRO, G. L., PIOVESAN, N. D., MORAIS, A. T., MENEZES, C. C., CANO, M. A. O., FIETTO, L. G., LOUREIRO, M. E., ARAGAO, F. J. L., FONTES, E. B. P. The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. **Journal of Experimental Botany**., v. 60, p. 533-546, 2009.

VERSLUES, P. E., AGARWAL, M., KATIYAR-AGARWAL, S., ZHU, J., ZHU, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought,salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, Michigan, v. 45, p. 523-539, 2006.

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

VIDAL, J. L.M., ESPADA, M. C. P., FRENICH, A. G., ARREBOLA, F. J. **J.Chomatogr.A**, v.867, p. 235, 2000.

VILLAS-BÔAS, S. G., MAS, S., AKESSON, M., SMEDSGAARD, J., NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, p. 613– 646, 2005.

TAMBUSSI, E. A., BARTOLI, C. G., BELTRANO, J., GUIAMET, J. J., ARAUS, J. L. Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*). **Physiology Plantarum**, v. 108, p. 398-404, 2000.

THISSEN, U., COULIER, L., OVERKAMP, K. M., JETTEN, J., WERFF, B. J. C., VEN, T. VAN de, WERF, M. J., VAN DER. Proper metabolomics strategy supports efficient food quality improvement: A case study on tomato sensory properties. **Food Quality and Preference**. v. 22, n. 6, p. 499–506, Sep. 2011.

XIA, J., WISHART, D. S. Web-based inference of biological patterns functions and pathways from metabolomic data using Metaboanalyst. **Nature Protocols**. v. 6, n. 6, p. 743 – 760, 2011.

WANG, W., SCALI, M., VIGNANI, R., SPADAFORA, A., SENSI, E., MAZZUCA, S., CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 24, p. 2369–2375, 2003.

WANG, W., VINOCCUR, B., ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, Berlin, v. 218, p. 1-14, 2003.

WEIDHASE, R. A., KRAMELL, H. M., LEHMANN, J. Methyl jasmonate induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf fragments. **Plant Science**, Clare, v. 51, n. 2/3, p. 177-186, 1987.

WERNER, J. E., FINKELSTEIN, R. R. *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. **Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 34, p.913-922, 1995.

WESTERMEIER, R., LOYLAND, S., ASBURY, R. Proteomics technology. **Journal of Clinical Ligand Assay**, v. 25, p. 1-11, 2002.

WILKINSON, S., DAVIES, W. J. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. **Plant, cell & environment**, v.33, n.4, p. 510-25, 2010.

WRIGHT, P. C., NOIREL, J., OW, S. Y, FAZELI, A. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. **Theriogenology**, v. 77, n. 4, p. 738- 765, 2012.

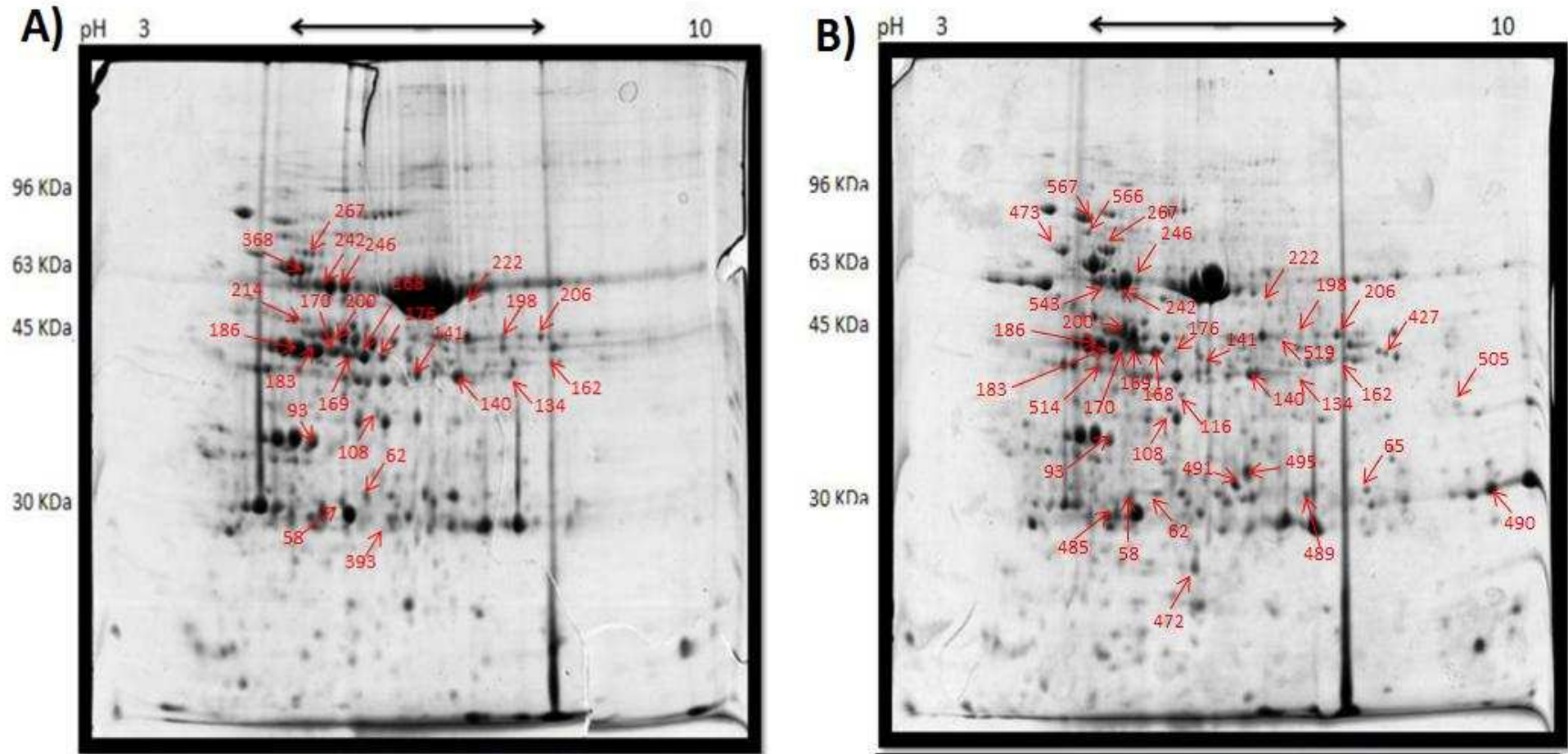
WYN JONES, R.G., GORHAM, J. Osmoregulation. In: LANGE, D.L.; NOBEEL, P.S.; OSMOND, C.B.; ZIEGLER, H. Encyclopedia of plant physiology: physiological plant ecology. III-Response to chemical and biological environment. **Springer-Verlag**, Berlin: p.35-58, 1983.

YASUDA, M., ISHIKAWA, A., JIKUMARU, Y., SEKI, M., UMEZAWA, T., ASAMI, T., MARUYAMA-NAKASHITA, A., KUDO, T., SHINOZAKI, K., YOSHIDA, S., NAKASHITA, H. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 20, p. 1678-1692, 2008.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI. K., SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annu Rev Plant Biol**, v.57, p. 781-803, 2006.

ZHU, T., BUDWORTH, P., HAN, B., BROWN, D., CHANG, H. S., ZOU, G., WANG, X. Toward elucidating the global expression patterns of developing *Arabidopsis*: parallel analysis of 8300 genes by a high-density oligonucleotide probe array. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 39, p. 221-242, 2001.

## Anexo 1



**Anexo 1.** Perfil proteico em gel 2-DE do extrato de soja no genótipo WT. (A) Representa perfil proteico das plantas WT Irrigadas e (B) WT Não irrigadas. As setas indicam os spots diferenciais identificados por LC-MS. Géis corados com *Coomassie Blue G-250*

**Anexo 2.** Proteínas com abundância diferencial em folhas de soja convencional (WT) sob déficit hídrico e identificadas por MS.

ID	Proteína	Acesso	Cobertura	Numero de Peptídeo	Media da % de volume ±DP		Abundância
					Irrigado	Não Irrigada	
<b>Fotossíntese</b>							
393	Photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 2	Glyma02g45190.1	19%	5	0,205±0,065	0,000±0,000	0,205
116	Ferredoxin—NADP reductase, leaf isozyme 2, chloroplastic	Glyma02g05350.1	09%	3	0,000±0,000	0,074±0,011	0,074
141	Fructose-bisphosphate aldolase activity	Glyma12g04150.1	44%	2	0,349±0,103	0,201±0,004	1,736
93	Photosystem II Subunit O-2	Glyma01g38750.1	15%	3	0,635±0,175	0,316±0,024	2,000
176	Phosphoglycerate kinase, putative	Glyma15g41540.1	22%	3	0,273±0,160	0,077±0,019	3,545
169	Phosphoglycerate kinase, putative	Glyma15g41540.1	49%	3	0,201±0,085	0,090±0,018	2,233
134	Fructose-bisphosphate aldolase, putative	Glyma11g11900.1	23%	10	0,112±0,058	0,097±0,071	1,154
140	Fructose-bisphosphate aldolase, putative	Glyma11g11900.1	33%	3	0,551±0,196	0,625±0,283	1,134
162	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Glyma04g36870.3	30%	5	0,122±0,059	0,202±0,024	1,655

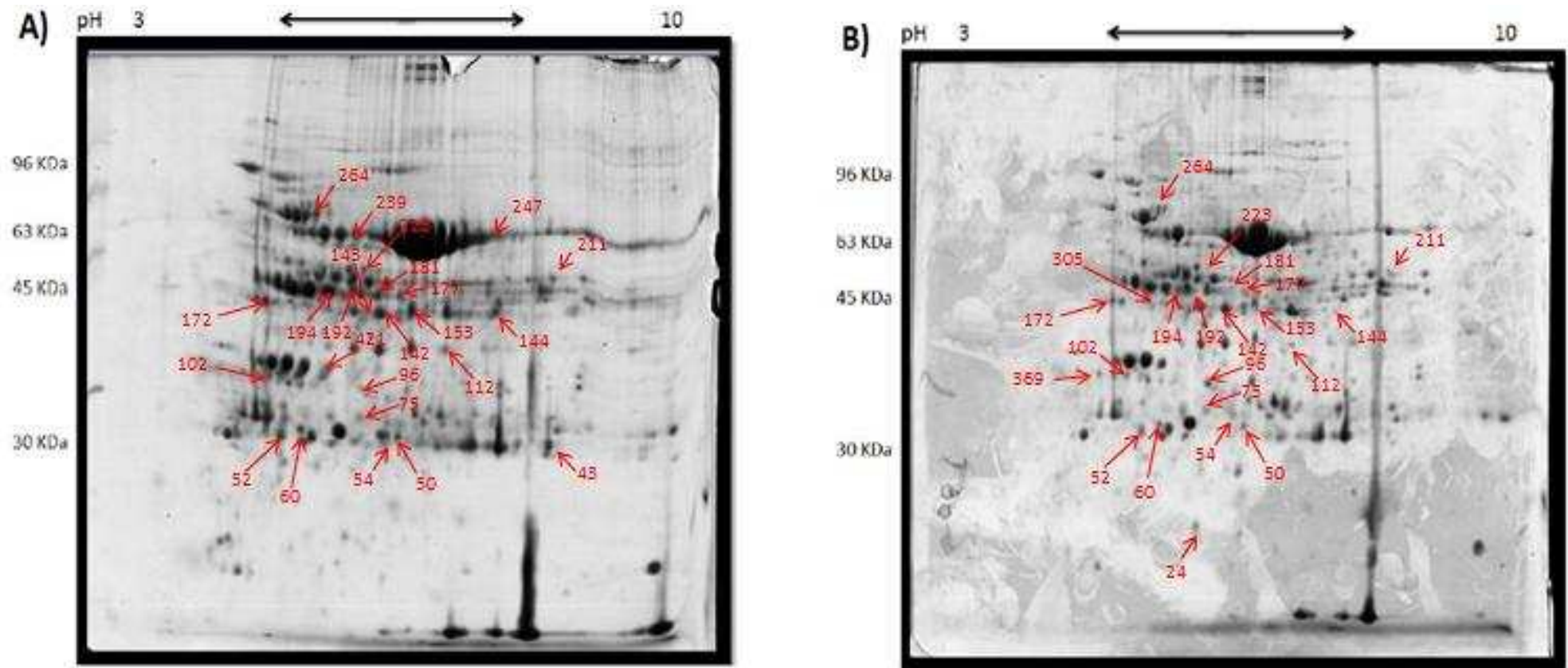
198	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Glyma16g04940.1	20%	6	0,207±0,125	0,066±0,008	3,136
170	Beta-form rubisco activase	Glyma18g04081.1	33%	14	0,779±0,125	0,160±0,087	4,868
214	Ribulose-bisphosphate carboxylase small chain	Glyma02g41700.1	25%	3	0,035±0,008	0,000±0,000	0,035
186	Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic-like	Glyma11g34230.4	38%	3	1,809±0,151	1,212±0,151	1,504
222	Fructose-bisphosphate aldolase, putative	Glyma12g04150.1	07%	2	0,034±0,006	0,082±0,030	2,411
183	Beta-form rubisco activase	Glyma18g04081.	38%	3	1,614±0,278	0,942±0,102	1,713
368	ATP synthase subunit alpha	Glyma12g36106.1	30%	16	0,222±0,075	0,000±0,000	0,222
<b>Glicólise</b>							
427	Fructose-bisphosphate aldolase, putative	Glyma14g36850.1	14%	6	0,000±0,000	0,097±0,033	0,097
473	Fructose-bisphosphate aldolase, class I	Glyma02g38730.1	42%	6	0,000±0,000	0,351±0,217	0,351
495	Triosephosphate isomerase	Glyma03g34300.1	08%	2	0,000±0,000	1,000±0,585	1,000
246	Phosphopyruvate hydratase-Enolase	Glyma03g34830.1	08%	2	0,637±0,020	0,215±0,109	2,962
<b>Respiração</b>							
519	Alcohol dehydrogenase	Glyma03g32590.4	09%	3	0,000±0,000	0,067±0,031	0,067

543	ATP synthase beta chain 2	Glyma10g41330.1	44%	2	0,000±0,000	0,427±0,030	0,427
<b>Estresse</b>							
472	HSP21-heat shock protein 21	Glyma04g40790.1	27%	7	0,000±0,000	0,186±0,137	0,186
62	Ascorbate peroxidase 1	Glyma11g15680.5	24%	2	0,155±0,004	0,206±0,024	1,329
485	Iron-superoxide dismutase	Glyma10g33710.1	45%	5	0,000±0,000	0,177±0,096	0,177
58	Superoxide dismutase activity	Glyma20g33880.2	40%	3	0,367±0,056	0,094±0,057	3,904
567	BiP isoform B	Glyma05g36620.1	26%		0,000±0,000	0,165±0,094	0,165
473	Chloroplast / 60 kDa chaperonin alpha subunit	Glyma12g08310.1	34%	2	0,000±0,000	0,351±0,217	0,351
267	Chaperonin, putative	Glyma08g18760.1	57%	3	0,060±0,023	0,210±0,065	3,500
<b>Metabolismo de Aminoácidos</b>							
206	Aminomethyltransferase, mitochondrial	Glyma17g01550.4	26%	10	0,149±0,054	0,233±0,069	1,563
<b>Metabolismo Secundário</b>							
108	Dihydroflavonol reductase	Glyma18g06510.1	36%	3	0,058±0,021	0,097±0,004	1,672

Outros Processos							
242	Beta-amylase	Glyma06g45700.1	13%	5	0,995±0,230	1,637±0,137	1,645
489	Lectin protein kinase, putative	Glyma02g18090.1	13%	3	0,000±0,000	0,185±0,046	0,185
65	Lectin protein kinase, putative	Glyma02g18090.1	31%	8	0,000±0,000	0,105±0,012	0,105
514	HCF136 (High chlorophyll fluorescence 136)	Glyma12g03020.1	31%	12	0,000±0,000	0,136±0,037	0,136
490	Acid phosphatase activity	Glyma07g01730.1	41%	17	0,000±0,000	0,499±0,123	0,499
491	Acid phosphatase activity	Glyma08g21410.1	37%	11	0,000±0,000	0,396±0,145	0,396
200	Elongation factor Tu, chloroplastic-like	Glyma04g36250.1	25%	2	0,756±0,211	1,253±0,196	1,657
168	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase, chloroplastic Phosphoglycerate kinase	Glyma15g41540.1	45%	6	0,530±0,110	0,322±0,240	1,645
Desconhecidas							
505	Uncharacterized	Glyma09g38010.4	14%	2	0,000±0,000	0,098±0,031	0,098
566	Uncharacterized	Glyma13g19331.1	26%	2	0,000±0,000	0,017±0,005	0,17

Os valores representam as médias do volume (abundancia relativa) ± o desvio padrão de três réplicas biológicas. As barras azuis representam o quanto a proteína aumentou na condição de déficit hídrico em relação a condição controle. As barras vermelhas significam o quanto a proteína diminuiu na condição de déficit hídrico em relação à condição controle.

### Anexo 3



**Anexo 3.** Perfil proteico em gel 2-DE do extrato de soja no genótipo C9. (A) Representa perfil proteico das plantas C9 Irrigadas e (B) C9 Não irrigadas. As setas indicam os spots diferenciais identificados por LC-MS. Géis corados com *Coomassie Blue G-250*.

**Anexo 4.** Proteínas com abundância diferencial em folhas de soja transformada (C9) sob déficit hídrico e identificadas por MS

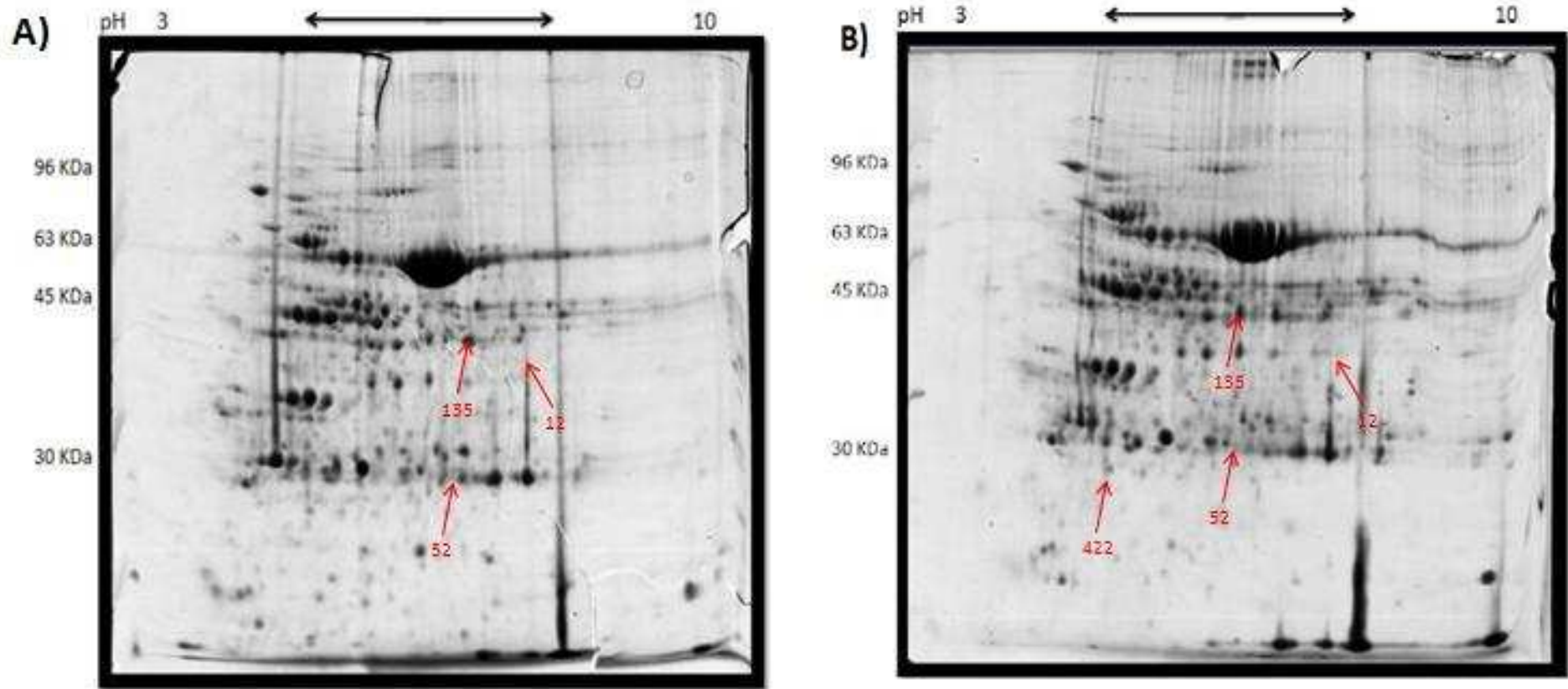
ID	Proteína	Acesso	Cobertura	Numero de Peptídeo	Media da % de volume ±DP		Abundância
					Irrigado	Não Irrigada	
<b>Fotossíntese</b>							
52	Fotossistema II-oxygen-evolving enhancer protein	Glyma08g41660.1	13%	2	0,462±0,046	0,269±0,178	1,717
177	Phosphoglycerate kinase	Glyma15g41540.1	26%	3	0,246±0,115	0,138±0,055	1,782
142	Fructose-bisphosphate aldolase, putative	Glyma12g04150.1	58%	2	0,487±0,114	0,745±0,106	1,529
421	PhotosystemII subunit o-2	Glyma02g06830.1	20%	2	0,296±0,015	0,000±0,000	0,296
181	Phosphoglycerate kinase	Glyma15g41540.1	34%	3	0,373±0,119	0,233±0,278	1,600
172	Sedoheptulose-bisphosphatase	Glyma11g34900.1	37%	2	0,320±0,140	0,401±0,152	1,253
102	Phosphoglycolate phosphatase	Glyma09g38340.3	25%	3	0,149±0,012	0,158±0,098	1,060
153	Fructose-bisphosphate aldolase, putative	Glyma04g01020.1	44%	4	0,681±0,149	0,255±0,056	2,670
264	Rubisco activase	Glyma15g40110.1	16%	10	0,237±0,080	0,000±0,000	0,237
194	Beta-form rubisco activase	Glyma18g04081.1	37%	9	1,307±0,559	0,571±0,479	2,288

50	Rubisco activase	Glyma11g34230.4	15%	5	0,217±0,102	0,184±0,061	1,179
192	Beta-form rubisco activase	Glyma18g04081.1	17%	8	0,485±0,242	0,141±0,102	3,439
112	Ferredoxin reductase	glyma11g08230.1	43%	16	0,172±0,111	0,119±0,051	1,445
43	Carbonic anhydrase 1	Glyma19g01050.8	17%	4	0,374±0,061	0,000±0,000	0,374
54	Carbonic anhydrase 1	Glyma19g01050.8	38%	11	0,577±0,078	0,195±0,155	2,958
<b>Metabolismo de Aminoácidos</b>							
239	Alanine aminotransferase	Glyma01g03260.1	21%	3	0,181±0,057	0,000±0,000	0,181
211	Aminomethyltransferase	Glyma17g01550.4	24%	2	0,190±0,047	0,156±0,127	1,217
<b>Metabolismo Secundário</b>							
223	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase activity	Glyma16g10880.3	30%	17	0,321±0,110	0,090±0,072	3,566
<b>Outros Processos</b>							
143	Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	Glyma18g19050.1	35%	3	0,204±0,172	0,000±0,000	0,204
305	Adenosine kinase 1	Glyma13g20780.1	16%	5	0,000±0,000	0,154±0,030	0,154
96	Lectin protein kinase, putative	Glyma02g18090.1	42%	14	0,070±0,042	0,215±0,046	3,071

369	Plastid-lipid associated protein PAP, putative	Glyma15g11910.1	44%	11	0,000±0,000	0,104±0,031	0,104
75	Ubiquitina- 20S proteasome alpha subunit	Glyma06g39710.1	14%	3			1,742
<b>Desconhecidas</b>							
144	Uncharacterized	Glyma10g03200.1	10%	4	0,237±0,111	0,109±0,089	2,174
247	Uncharacterized	Glyma11g14410.1	06%	2	0,691±0,448	0,000±0,000	0,691
60	Uncharacterized	Glyma18g16080.1	17%		0,293±0,060	0,171±0,014	1,713
24	Uncharacterized	Glyma11g21001.1	28%	13	0,000±0,000	0,156±0,086	0,156

Os valores representam as médias do volume (abundancia relativa) ± o desvio padrão de três réplicas biológicas. As barras azuis representam o quanto a proteína aumentou na condição de déficit hídrico em relação à condição controle. As barras vermelhas significam o quanto a proteína diminuiu na condição de déficit hídrico em relação à condição controle.

## Anexo 5



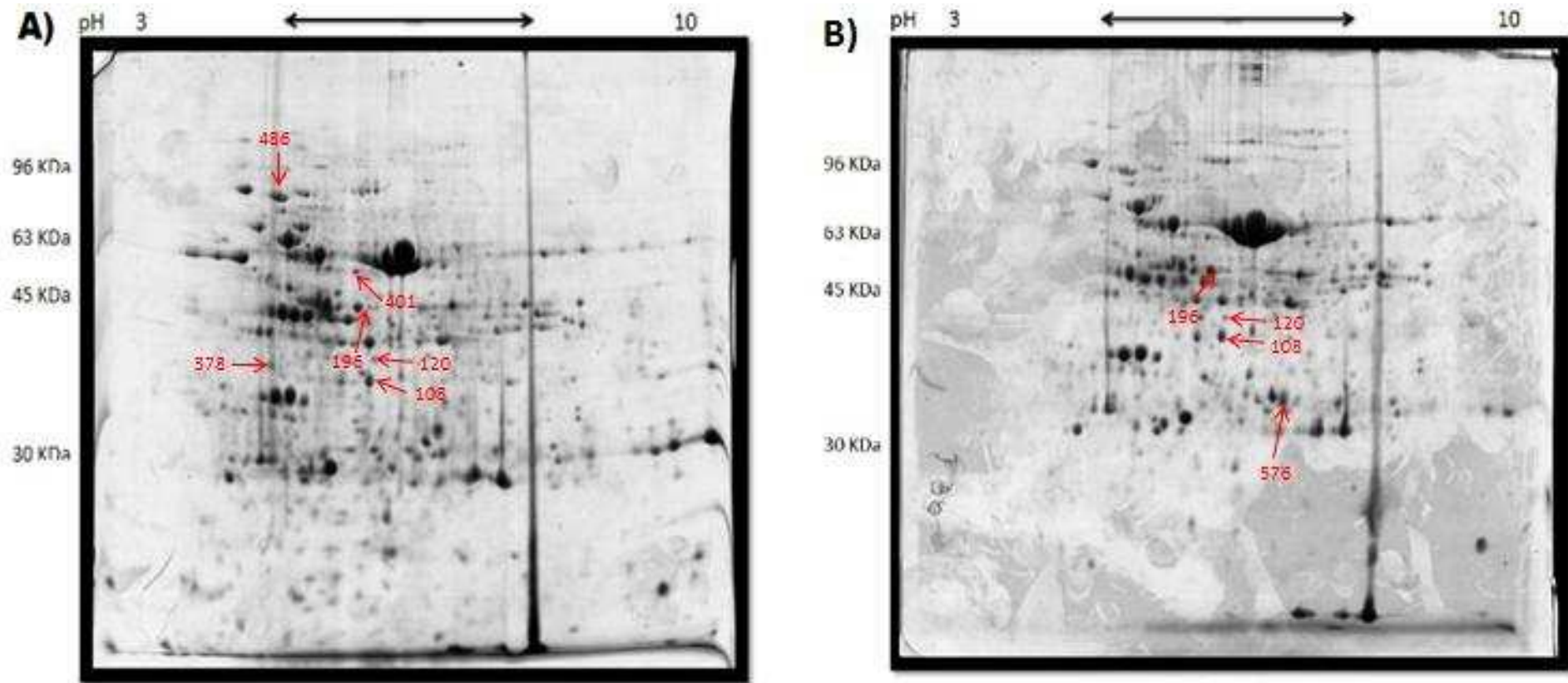
**Anexo 5.** Perfil proteico em gel 2-DE do extrato de soja dos genótipos WT e C9 em condição irrigada. (A) Representa perfil proteico das plantas WT Irrigadas e (B) C9 irrigadas. As setas indicam os *spots* diferenciais identificados por LC-MS. Géis corados com *Coomassie Blue G-250*.

**Anexo 6.** Proteínas com abundância diferencial em folhas de soja WT e transformadas (C9) sem déficit hídrico e identificadas por MS

ID	Proteína	Acesso	Cobertura	Numero de Peptídeo	Media da % de volume $\pm$ DP		Abundância
					WT Irrigado	C9 Irrigada	
<b>Fotossíntese</b>							
52	Fotossistema II-oxygen-evolving enhancer protein 2	Glyma08g41660.1	29%	5	0,289 $\pm$ 0,159	0,489 $\pm$ 0,016	1,692
135	Fructose-bisphosphate aldolase, putative	Glyma12g04150.1	44%	2	0,346 $\pm$ 0,039	0,698 $\pm$ 0,135	2,017
422	Carbonic anhydrase 1	Glyma19g01050.8	17%	4	0,000 $\pm$ 0,000	0,395 $\pm$ 0,086	0,395
<b>Estresse</b>							
12	Chaperonin 20	Glyma09g08340.1	37%	11	0,708 $\pm$ 0,425	0,025 $\pm$ 0,023	28,32

Os valores representam as médias do volume (abundancia relativa)  $\pm$  o desvio padrão de três réplicas biológicas. As barras azuis representam o quanto a proteína aumentou no genótipo C9 em relação ao WT sem déficit hídrico. As barras vermelhas significam o quanto a proteína diminuiu no genótipo C9 em relação ao WT sem déficit hídrico

## Anexo 7



**Anexo 7.** Perfil proteico em gel 2-DE do extrato de soja dos genótipos WT e C9 submetidos à deficiência hídrica. (A) Representa perfil proteico das plantas WT Não Irrigadas e (B) C9 Não irrigadas. As setas indicam os spots diferenciais identificados por LC-MS. Géis corados com *Coomassie Blue* G-250.

**Anexo 8.** Proteínas com abundância diferencial em folhas de soja WT e transformadas (C9) em déficit hídrico e identificadas por MS.

ID	Proteína	Acesso	Cobertura	Numero de Peptídeo	Media da % de volume ±DP		Abundância
					WT Não Irrigada	C9 Não Irrigada	
<b>Fotossíntese</b>							
108	Ferredoxin reductase	Glyma02g05350.1	47%	3	0,344±0,054	0,517±0,092	1,502
120	Ferredoxin reductase	Glyma02g05350.1	09%	3	0,074±0,011	0,106±0,047	14,940
576	Carbonic anhydrase 1	Glyma19g01050.8	67%	26	0,000±0,000	0,595±0,160	0,595
<b>Metabolismo de Aminoácidos</b>							
401	Alanine aminotransferase	Glyma01g03260.1	39%	19	0,097±0,031	0,000±0,000	0,093
196	Glutamine synthetase	Glyma15g10890.5	51%	24	0,397±0,057	0,740±0,201	1,863
486	Serine hydroxymethyltransferase	Glyma18g27710.2	%	23	0,128±0,063	0,000±0,000	0,128
<b>Desconhecidas</b>							
378	Uncharacterized	Glyma05g30040.1	36%	14	0,177±0,024	0,000±0,000	0,691

Os valores representam as médias do volume (abundancia relativa) ± o desvio padrão de três réplicas biológicas. As barras azuis representam o quanto a proteína aumentou no genótipo C9 em relação ao WT em condição de déficit hídrico. As barras vermelhas significam o quanto a proteína diminuiu no genótipo C9 em relação ao WT em condição de déficit hídrico.