

ROSILENE OLIVEIRA MESQUITA

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E ANÁLISE PROTEÔMICA
DIFERENCIAL DE GENÓTIPOS DE SOJA SUBMETIDOS A
*DEFICIT HÍDRICO***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

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

T

M582c
2010

Mesquita, Rosilene Oliveira, 1984-

Caracterização fisiológica e análise proteômica diferencial
de genótipos de soja submetidos a *deficit* hídrico / Rosilene
Oliveira Mesquita. – Viçosa, MG, 2010.
xi, 71f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marcelo Ehlers Laureiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 64-71.

1. *Glycine max*. 2. Deficit hídrico. 3. Eletroforese.
4. Espectrometria de massa. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 635.655

ROSILENE OLIVEIRA MESQUITA

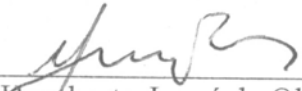
**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E ANÁLISE PROTEÔMICA
DIFERENCIAL DE GENÓTIPOS DE SOJA SUBMETIDOS A *DEFICIT*
HÍDRICO**

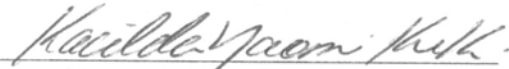
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

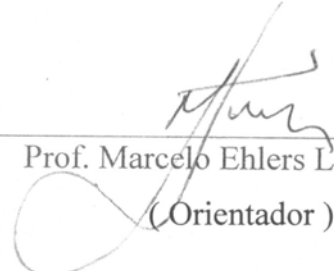
APROVADA: 18 de fevereiro de 2010


Prof. Everaldo Gonçalves de Barros
(Coorientador)


Prof.^a. Elisabeth Pacheco Batista Fontes


Prof. Humberto Josué de Oliveira Ramos


Dra. Kacilda Naomi Kuki


Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(Orientador)

Aos meus pais Manuel e Lúcia,
ao meu irmão Rodney e minha tia Celir,
DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pela oportunidade, disponibilidade de espaço físico e convívio social.

Ao meu orientador, Marcelo Ehlers Loureiro, pela oportunidade a mim estendida, pela confiança depositada, preocupação e generosidade. Também, pelo constante incentivo e encorajamento.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros pela Coorientação e disponibilidade sempre que foi solicitado, os meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Humberto Josué de Oliveira Ramos pela grandiosa ajuda nas análises de proteômica e pela participação da banca examinadora.

A Prof^a. Elisabeth Pacheco Batista Fontes e Dra. Kacilda Naomi Kuki, pela aceitação em participar da banca examinadora, pelas grandiosas sugestões para o trabalho.

Ao projeto Genosoja pela oportunidade de trabalhar com proteôma.

Ao Nucleo de análises de BioMoléculas pela realização de toda parte relacionada a proteômica.

Ao meu orientador de Iniciação Científica da Embrapa (CNPAT), Dr. Marlos Alves Bezerra, pela confiança, generosidade, incentivo e amizade. Também, pela disposição em ceder o scanner para digitalização dos géis bidimensionais.

Aos professores que ministraram disciplinas durante o Mestrado: Marcelo Loureiro, Marco Aurélio, Fábio DaMatta, Raimundo Barros, Juraci Alves, Andrea Miyasaka e José Cambraia.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, pelo convívio e amizade: Camilo, Valdir, Ivan, Danilo, Daniela, Sabrina, Eduardo, Gustavo, Aleson, Aguida, Alan, André, Alice Pita, Werner e Francis.

A Carla Quinhones pela amizade e grande contribuição no meu aprendizado.

A Técnica de Laboratório Mercês, pelo auxílio e disponibilidade na realização das atividades laboratoriais.

A minha família que sempre depositou confiança contribuiu para que alcançasse mais esta etapa.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal: Carlos Raimundo e Antonio Cordeiro pela disposição em ajudar.

Aos amigos, colegas e todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ROSILENE OLIVEIRA MESQUITA, filha de Manuel Francisco Oliveira e Raimunda Lúcia de Mesquita Oliveira, nasceu em Fortaleza, CE no dia 23 de março de 1984. Concluiu o ensino médio em dezembro de 2001, no colégio Liceu Estadual, em Maracanaú, CE. Em março de 2003 iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza, CE, graduando-se em dezembro de 2007. Ingressou, em março de 2008, no mestrado no Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, obtendo o título de *Magister Scientiae* em 18 de fevereiro de 2010.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	01
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1 Material vegetal, condução do experimento e delineamento experimental.....	10
3.2 Caracterização das respostas fisiológicas.....	11
3.2.1 Potencial hídrico foliar.....	11
3.2.2 Trocas gasosas.....	12
3.2.3 Parâmetros de fluorescência.....	12
3.2.4 Determinação de pigmentos cloroplastídicos.....	13
3.2.5 Determinação da peroxidação lipídica.....	13
3.2.6 Determinação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo.....	14
3.3 Extração de proteínas totais de folhas de soja.....	15
3.4 SDS-PAGE-1D.....	16
3.5 Separação das proteínas solúveis em géis bidimensionais.....	17
3.6 Visualização das proteínas e análise da imagem após digitalização dos géis bidimensionais.....	17
3.7 Digestão trípica.....	18
3.8 Análise por espectrometria de massa.....	19
4 RESULTADOS.....	20
4.1 Potencial hídrico.....	20
4.2 Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i>	21
4.3 Danos celulares e atividade enzimática.....	26
4.4 Teores de pigmentos cloroplastídicos.....	29
4.5 Otimização de um protocolo de extração de proteínas de folhas de soja mais eficiente para análise proteômica.....	31

4.6 Análise do proteoma diferencial em folhas de soja de cultivares contrastantes ao déficit hídrico.....	32
4.7 Análise do proteoma diferencial de proteínas responsivas ao déficit hídrico no cultivar tolerante (Embrapa 48).....	44
5 CONCLUSÕES.....	63
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

RESUMO

MESQUITA, Rosilene Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2010. **Caracterização fisiológica e análise proteômica diferencial de genótipos de soja submetidos a *deficit* hídrico.** Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Coorientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Andrea Miyasaka de Almeida.

Entre os fatores abióticos que limitam a produtividade das plantas destaca-se a disponibilidade hídrica do solo. Compreender os mecanismos como plantas respondem ao estresse hídrico é crucial para prever os impactos das alterações climáticas sobre a produtividade das culturas e dos ecossistemas. O presente trabalho teve por objetivo identificar proteínas cuja alteração de sua expressão esteja associada à maior tolerância a seca em soja e que permita fornecer evidências sobre mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos na resposta ao *deficit* hídrico em soja, caracterizando fisiologicamente os genótipos contrastantes. As plantas foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle) e sob *deficit* hídrico imposto pela suspensão da irrigação até que as plantas atingissem um potencial hídrico na antemanhã (ψ_{am}) de -1,0 MPa (moderado) e -1,5MPa (severo). As plantas do cultivar BRS 16 (sensível à seca) alcançaram o ψ_{am} com uma média de atraso de dois dias para ambos os níveis de *deficit* em relação ao cultivar Embrapa 48 (tolerante à seca). Estes resultados são consistentes com uma melhor economia hídrica no cultivar tolerante. As análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a mostraram que estes cultivares exibem mecanismos diferenciais em resposta às condições de *deficit* hídrico. Sob estresse moderado, a fotossíntese (A) foi maior no cultivar tolerante, embora não fosse detectada diferença em condutância estomática (g_s) e na razão C_i/C_a entre os cultivares. A redução proporcional da transpiração (E) sob estresse hídrico progressivo sempre foi menor no cultivar tolerante, contribuindo para que o mesmo tenha tido sempre um maior nível de eficiência do uso da água. Na ausência de estresse e sob *deficit* hídrico moderado, houve um paralelismo entre a redução da A e a ETR , mostrando sempre o cultivar tolerante as maiores taxas. Quando sob condições de *deficit* hídrico, ambos os cultivares apresentaram um aumento na fração de luz absorvida que não é dissipada termicamente e nem utilizada na fase fotoquímica do FSII (P_E). Analisando a fração de luz absorvida

que é dissipada termicamente (D), o cultivar tolerante Embrapa 48 apresentou menores valores de D, quando comparados ao cultivar sensível BRS 16, tanto em condições irrigadas, quanto sob *deficit*. Entretanto este aparente excesso de energia não foi traduzido em dano oxidativo, sugerindo que os mecanismos antioxidativos teriam uma maior atividade frente a maior geração de espécies reativas de oxigênio no cultivar sensível. As proteínas diferencialmente expressas de folhas de soja foram analisadas através de géis bidimensionais associados a identificação por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF). Os dados da análise proteômica diferencial dos cultivares contrastantes revelam que existe uma modulação na expressão de proteínas com destaque para proteínas do metabolismo, como as de síntese de aminoácidos e fotossintéticas, as quais mostraram-se mais abundantes no cultivar tolerante tanto na condição irrigada como sob *deficits*, sendo que sob estresse severo houve uma redução na expressão de proteínas Fe-SOD relacionadas ao estresse oxidativo, o que confirma os dados de maior atividade enzimática desta enzima no cultivar sensível, nestas condições. O estudo do proteoma diferencial no cultivar tolerante apresentou somente duas proteínas com possíveis funções na sinalização da resposta ao estresse hídrico. Uma delas é a anexina 1, expressa em maiores níveis sob estresse moderado. A outra proteína de sinalização induzida no cultivar Embrapa 48 sob estresse hídrico é uma proteína da classe do fator transcricional MYB R2R3. Este trabalho ilustra o valor do uso combinado de estudos fisiológicos associados à análise do proteoma diferencial. Melhor encadeamento de evidências é obtido, e uma seleção mais clara de mecanismos de tolerância potenciais pode ser realizada, apesar do limitado número de proteínas de função conhecidas identificadas como diferencialmente expressas.

ABSTRACT

MESQUITA, Rosilene Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Physiological characterization and differential proteomic analysis of soybean genotypes subjected to water deficit.** Advisor: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-Advisors: Everaldo Gonçalves de Barros and Andrea Miyasaka de Almeida.

Among the abiotic factors that limit plant productivity stands out the soil water availability. Understanding the mechanisms how plants respond to drought stress is crucial for predicting the impacts of climate change on crop productivity and ecosystem. This study aimed to identify proteins whose change in expression is associated with greater tolerance to drought in soybean and that can provide evidence about physiological and molecular mechanisms involved in the response to water deficit in soybean, characterizing physiologically contrasting genotypes. The plants were evaluated under full irrigation (control) and under water deficit imposed by suspending irrigation until the plants reached a water potential at predawn (ψ_{am}) of -1.0 MPa (moderate) and -1.5 MPa (severe). Plants of the cultivar BRS 16 (sensitive to drought) ψ_{am} reached with an average delay of two days for both levels of deficit in relation to cultivar Embrapa 48 (drought tolerant). These results are consistent with improved water economy in the tolerant cultivar. The analysis of gas exchange and chlorophyll fluorescence showed that these cultivars exhibit differential mechanisms in response to water deficits. Under moderate stress, photosynthesis (A) was higher in tolerant cultivar, though not detect any difference in stomatal conductance (g_s) and Ci/Ca between the cultivars. The proportional reduction in transpiration (E) under progressive water stress was always lower in the tolerant cultivar, contributing to it has always had a higher level of efficiency of water use. In the absence of stress and under moderate water deficit, there was a parallelism between the reduction of A and ETR , always showing the highest rates tolerant cultivar. When under water deficits, both cultivars showed an increase in the fraction of light absorbed that heat is not dissipated and not used in phase photochemistry of PSII (PE). Looking at the fraction of light absorbed that is dissipated thermally (D), the tolerant cultivar had lower values of D, when compared to the sensitive cultivar, both in irrigated conditions, and under deficit. However, this apparent

excess energy has not been translated into oxidative damage, suggesting that the mechanisms would have a higher antioxidant activity against higher generation of reactive oxygen species in sensitive genotype. The proteins differentially expressed in soybean leaves were analyzed by two-dimensional gels associated with identification by mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF). Data from the differential proteomic analysis of contrasting cultivars show that there is a modulation in the expression of proteins with emphasis on protein metabolism, such as amino acid synthesis and photosynthesis, which were more abundant in both the tolerant cultivar under irrigated condition as deficits, and under severe stress there was a reduction in the expression of Fe-SOD proteins related to oxidative stress, which confirms the data of higher enzyme activity of this enzyme in sensitive genotype under these conditions. The study of proteome differential tolerant cultivar showed only two proteins with potential roles in signaling in response to water stress. One is annexin 1, expressed at higher levels under moderate stress. The other signaling protein induced in Embrapa 48 under water stress protein is a class of R2R3 MYB transcription factor. This work illustrates the value of combined use of physiological studies related to analysis of proteome differential. Best chain of evidence is obtained, and a lighter selection of potential mechanisms of tolerance can be achieved despite the limited number of proteins of known function identified as differentially expressed.

1 INTRODUÇÃO

Entre os fatores abióticos que limitam a produtividade das plantas destaca-se a disponibilidade hídrica do solo. As condições de *deficit* hídrico induzem respostas fisiológicas e bioquímicas nas plantas incluindo fechamento estomático, redução do crescimento celular, redução da taxa fotossintética, aumento da taxa respiratória, ajustamento osmótico, redução na eficiência do uso da água, alteração da partição de assimilados e dos mecanismos de defesa contra danos oxidativos (LUDLOW & MUCHOW, 1990; SHINOZAKI & YAMAGUSHO- SHINOZAKI, 2007), o que correspondem a mecanismos de adaptação ou tolerância em níveis moleculares e celulares (SHINOZAKI & YAMAGUSHO- SHINOZAKI, 2007).

Na medida em que a água torna-se limitante, com o fechamento estomático, ocorre uma limitação no dióxido de carbono (CO₂) disponível para assimilação na fotossíntese e, como resultado, um decréscimo na eficiência quântica e um excesso de energia nos centros de reação dos fotossistemas, resultando no aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (superóxido, oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil, entre outros) que causam peroxidação de lipídeos, danos celulares, e danos oxidativos em enzimas do ciclo de Calvin que reduzem sua atividade enzimática, entre outros danos (TAMBUSSI *et al.*, 2000). Sendo assim, sob condições de *deficit* hídrico, o aparecimento de danos oxidativos é potencializado podendo resultar em danos fotoinibitórios e fotooxidativos (SMIRNOFF, 1995; ASADA, 1999)

Sob o estresse hídrico, há uma série de respostas nas plantas, desde a percepção, a ativação de rotas de sinalização e alterações em nível de expressão gênica necessárias para induzir alterações fisiológicas no crescimento e desenvolvimento das plantas que contribuam com a redução dos danos associados a este estresse. Uma das respostas é alteração na expressão gênica, como evidenciado pela síntese de novas proteínas e de RNA mensageiro, e essas mudanças irão depender da espécie vegetal e do estágio de desenvolvimento, além da severidade do estresse (LAKSHMI *et al.*, 2009).

Muitas são as rotas que apresentam alterações decorrentes do estresse, entre as quais se destacam as alterações na tradução de proteínas envolvidas nas cascatas de

sinalização, controle transcricional, proteção a componentes celulares como membranas e proteínas, ajustamento osmótico, movimento de água e íons, e de destoxificação (BRAY, 1993; WANG *et al.* 2003; LAKSHMI *et al.*, 2009).

A quantidade de proteínas não é sempre correlacionada com a quantidade de mRNA, especialmente para proteínas de baixa abundância, havendo também diferenças na taxa de tradução. Além disso, muitas proteínas sofrem modificações pós-traducionais como remoção de peptídeos sinais, fosforilação, glicosilação que são extremamente importantes para atividade e localização sub-celular. Assim sendo, uma forma de melhor compreender as informações geradas pelo seqüenciamento genômico pode ser aliando-as ao estudo do proteoma (SETSUKE & NAGIB, 2009).

A proteômica vem sendo definida como a análise sistemática de conjuntos de proteínas presentes em tecidos, células ou compartimentos sub-celulares em um definido período de desenvolvimento em resposta a definidos estímulos. Pode ser usada para fins simples como identificar proteínas relacionadas a processos definidos, ou para fins tão complexos quanto à caracterização de modificações pós-traducionais e interações proteína-proteína (VAN WIJK, 2004).

Recentes avanços na proteômica têm permitido uma análise mais quantitativa, reprodutível, aliada à identificação de um maior número de proteínas. Análises espectrométricas por meio de técnicas de ionização do tipo “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization” (MALDI) ou “Electrospray Ionization” (ESI) são atualmente mais recomendáveis para o estudo de compostos não voláteis e termolábeis, como peptídios e proteínas (GLISH & VACHET, 2003). Ambas as técnicas, normalmente associadas ao analisador “Time-of-flight” (TOF) e às técnicas iniciais de preparo de amostras, podem fornecer a massa de um grande conjunto de peptídeos em tempo curto, e com alta acurácia (JOHNSSON, 2001). Estudos recentes têm demonstrado que na ausência do seqüenciamento genômico, dados de identificação de seqüências expressas (EST) têm sido utilizados para identificação de proteínas (MANN *et al.*, 2001; PORUBLEVA *et al.*, 2001; WATSON *et al.*, 2003).

Tendo em vista a variedade e complexidade dos processos fisiológicos envolvidos nos mecanismos de tolerância à seca, são necessárias informações que possibilitem selecionar aquelas proteínas que mais contribuam para o estabelecimento do processo de tolerância, de forma a conduzir estudos mais aprofundados que validem

a significância de sua participação nestes mecanismos de tolerância. Atualmente, as técnicas de biologia molecular podem oferecer alternativas para a redução do tempo de obtenção de novos genótipos de soja, visto que o melhoramento tradicional para essa cultura é um processo moroso e está sujeito ao risco de gerar genótipos com tolerância ao estresse hídrico limitado a ambientes específicos (LAKSHMI *et al.*, 2009).

Em soja pouco se sabe sobre as proteínas que são alteradas em condições de *deficit* hídrico. Portanto, identificar as proteínas de soja que são alteradas sob *deficit* hídrico, principalmente em genótipos contrastantes, pode permitir o entendimento das rotas de tolerância que são ativadas nesta espécie. Estas informações poderiam auxiliar o melhoramento de forma a sobrepor em seus genótipos diferentes mecanismos de tolerância aliado à análise fisiológica dos fenótipos.

Dada a importância da soja para o Brasil e a necessidade do bom desenvolvimento da mesma, independente da pluviosidade e capacidade hídrica de campo existente no solo, torna-se imprescindível o estudo e entendimento dos mecanismos utilizados pelas variedades resistentes com o intuito do melhoramento tradicional (hereditariedade) ou da transgenia.

Portanto, mapas proteômicos feitos a partir de géis bidimensionais podem detectar expressão protéica diferencial ligada a mecanismos de tolerância a seca. E a análise do proteoma na resposta a seca pode desvendar os mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos.

O presente trabalho teve por objetivo identificar proteínas cuja alteração de sua expressão esteja associada à maior tolerância a seca em soja e que permita fornecer evidências sobre mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos na resposta ao *deficit* hídrico em soja, caracterizando fisiologicamente os genótipos contrastantes. Essa caracterização fisiológica é importante para que as descrições de alterações no proteoma em integração às respostas fisiológicas caracterizadas sejam mais esclarecedoras.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e outras oleaginosas são importantes fontes de ácidos graxos e de proteínas para a nutrição humana. A soja processada é também a maior fonte de óleo vegetal e proteínas na alimentação animal, e também é utilizada para fins não alimentares, por exemplo, na produção de matérias-primas industriais e combustíveis (THELEN & OHLROGGE, 2002; SAKAI & KOGISO, 2008).

Entre os produtos agrícolas, a soja responde pela maior participação no Produto Interno Bruto (PIB), 23,7%, correspondendo a um mercado anual de R\$ 28,8 bilhões, segundo a Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária (CNA). A produção mundial de soja em 2007 foi de cerca de 219,8 milhões de toneladas, sendo que no Brasil, o complexo soja, é responsável por aproximadamente 300 mil empregos e proporcionou a entrada de quase 8 bilhões de dólares em 2003 através das exportações. A soja é uma cultura amplamente cultivada em todo mundo, tendo como maior produtor os EUA, seguido pelo Brasil (ABIOVE, 2004; SOYSTATS 2008; EMBRAPA SOJA, 2009).

No ambiente onde as plantas são cultivadas, estas são freqüentemente submetidas a condições externas adversas, resultando em estresses, que afeta de maneira desfavorável seu crescimento, desenvolvimento e/ou produtividade. Tais estresses podem ser bióticos (resultantes da ação de microorganismos, insetos e nematóides) e abióticos (resultantes do excesso ou *deficit* de algum fator físico ou químico do meio ambiente), podendo ocorrer de forma isolada ou combinada. Dentre os estresses abióticos destacam-se: inundações, salinidade, seca (*deficit* hídrico), deficiência ou excesso de nutrientes minerais, acidez e altas ou baixas temperaturas (AGHAEI *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2008; BRAY, 1997; CAMBRAIA, 2005).

Em soja, a seca reduz a produtividade em até 40 % (SPECHT *et al.* 1999). Dependendo das características híbridas, soja pode utilizar cerca de 450-700 mm de água durante a estação de crescimento (DOGAN *et al.* 2007). O período mais crítico para o estresse hídrico na cultura da soja é durante a fase de florescimento e no período

seguinte ao florescimento (MECKEL *et al.* 1984). Apesar da grande importância econômica da soja, estudos fisiológicos e moleculares referentes às variedades de soja brasileiras são bastantes escassos, assim como literaturas internacionais relacionando soja e seca. No entanto, a falta de água em fases importantes do desenvolvimento da soja é um dos grandes responsáveis pelas principais quedas de produção ocorridas durante vários anos no Brasil (EMBRAPA SOJA, 2009).

O *deficit* hídrico na planta ocorre, na maioria das vezes, quando a taxa de transpiração é superior à absorção de água, sendo comum durante o ciclo de diversas culturas agrícolas, inclusive a soja. Assim, um conhecimento adequado de como as plantas respondem a tal estresse abiótico é um dos pré-requisitos para escolher, tanto a melhor variedade, como as melhores práticas de manejo, visando, sobretudo, otimizar a exploração dos recursos naturais (BRAY, 1997; SMIT & SINGELS, 2006), tendo em vista que menos água seria desperdiçada, seja por escoamento superficial ou por drenagem (ROBERTSON *et al.*, 1999).

A água constitui aproximadamente 90% do peso da planta, atuando em praticamente todos os processos fisiológicos e bioquímicos. Desempenha a função de solvente, por meio do qual gases, minerais e outros solutos entram nas células e movem-se na planta. Tem, ainda, papel importante na regulação térmica da planta, agindo tanto no resfriamento como na manutenção e distribuição do calor (NEUMAIER & NEPOMUCENO, 1994).

A deficiência hídrica em plantas inicia-se a partir de uma complexa via de respostas, começando com a percepção do estresse, o qual desencadeia uma seqüência de eventos moleculares, finalizando com várias respostas fisiológicas, metabólicas e de desenvolvimento. Uma mudança no potencial hídrico, através da membrana plasmática, pode ser o principal fator que desencadeia as respostas ao estresse hídrico em nível molecular (BRAY, 1993).

As respostas das plantas ao estresse dependem da espécie, do genótipo, da duração e da severidade, da idade e estágio de desenvolvimento, do órgão e tipo de célula e do comportamento sub-celular. Dessa forma, as plantas podem apresentar tolerância ou resistência (quando sobrevive às adversidades) ou suscetibilidade (quando sofre redução em seu crescimento, podendo chegar à morte), dependendo da intensidade do estresse ao qual a planta é submetida (CAMBRAIA, 2005). A resistência ao estresse

hídrico se manifesta geralmente de quatro formas: a) limitação do crescimento, para minimizar a perda de água; b) adaptações morfológicas; c) adaptações fisiológicas; e d) alterações metabólicas. As três primeiras são processos complexos, conhecidos incompletamente, porém, progressos significativos foram obtidos no entendimento das alterações metabólicas (ARTLIP & WISNIEWSKI, 2001). A capacidade da planta em responder e sobreviver ao estresse hídrico depende dos mecanismos internos que integram as respostas celulares. Tais repostas podem ocorrer em alguns segundos (como mudanças no *status* de fosforilação de proteínas) ou em poucos minutos ou horas (como mudanças na expressão gênica) (SHINOSAKI & YAMAGUCHI-SHINOSAKI, 2007). Fisiologicamente, as plantas submetidas ao *deficit* hídrico podem apresentar respostas diferenciadas de acordo com a espécie, sendo a taxa fotossintética uma das variáveis que apresentam maior sensibilidade à seca. Porém, as plantas podem continuar realizando fotossíntese por tempo superior àquele destinado ao crescimento em expansão, pois o estômato responde mais lentamente no início do estresse hídrico que o turgor celular, responsável pelo alongamento de células que levam à expansão foliar (INMAN-BAMBER, 2004).

Steudle (2000) e Taiz & Zeiger (2004) relatam que uma das primeiras respostas das plantas à deficiência hídrica do solo é a síntese de ácido abscísico (ABA) no sistema radicular, o qual é translocado para a parte aérea induzindo o fechamento estomático, limitando, por conseguinte, a assimilação de CO₂. Os autores sugerem ainda que o ABA exerça efeito positivo no crescimento da raiz primária, por suprimir a produção de etileno e, por conseguinte, o desenvolvimento das raízes laterais. O ABA teria também um leve efeito negativo no crescimento da parte aérea, resultando em aumento marcante na razão raiz:parte aérea em baixos potenciais hídricos, o qual, juntamente com o efeito do ABA no fechamento estomático, auxilia a planta a reduzir a desidratação celular. Além disso, em resposta a condições adversas, muitas plantas acumulam metabólitos compatíveis no citoplasma de suas células, na tentativa de realizar o ajuste osmótico, evitando a redução do teor de água da célula (MUNNS, 2002).

Em soja, se a deficiência hídrica ocorre nas fases de germinação e emergência, diminui a densidade de plantas da lavoura. No florescimento, causa o aborto das flores e impede a antese; no enchimento dos grãos, afeta o peso dos grãos e, conseqüentemente, a produção (BERLATO, 1981; FAGERIA, 1989). A falta de água pode afetar ainda a eficiência do processo fotossintético, tanto de forma direta, com a desidratação do

citoplasma, como indiretamente, devido ao fechamento estomático (MIYASAKA E MEDINA, 1981).

Mudanças morfológicas, fisiológicas e de desenvolvimento de plantas apresentam bases moleculares e genéticas. Portanto, a caracterização de genótipos tolerantes ou sensíveis à seca é um pré-requisito para seleção e manipulação genética (TURNER, 1997).

A identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca em plantas são cruciais no desenvolvimento de novas variedades de soja mais tolerantes. A expressão diferencial de genes ainda não identificados em genótipos tolerantes pode ser usada para o estudo desses mecanismos de tolerância (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1996, 1997, 2007).

Uma resposta fisiológica específica ao *deficit* hídrico representa na verdade combinações de eventos moleculares que são ativados ou desativados pela percepção do estresse (SHINOSAKI & YAMAGUCHI-SHINOSAKI, 2007). Entender como estes eventos interagem entre si será um passo importante no desenvolvimento de maior tolerância à seca.

Considerando-se tolerância à seca como uma característica poligênica e difícil de ser trabalhada no melhoramento genético clássico, poucos programas de melhoramento se preocupam com essa característica (BEEVER, 2000). Conseqüentemente, poucos cultivares têm sido desenvolvidos com características de tolerância à seca. Dessa maneira, a fisiologia molecular assume papel chave na identificação pontual de genes ou de seus produtos (proteínas) envolvidos nas respostas ao *deficit* hídrico, o que permitirá futuramente a identificação e a compreensão de rotas metabólicas envolvidas nas respostas fisiológicas à seca.

Atualmente, verifica-se um aumento no interesse da comunidade científica pelas respostas fisiológicas das plantas a condições de estresses ambientais, devido ao fato de muitos dos mecanismos utilizados ainda não serem completamente compreendidos. Uma vez entendidas, as estratégias fisiológicas de reações aos estresses ambientais, estas poderão ser utilizadas como critério nos programas de melhoramento vegetal, para a produção de plantas economicamente viáveis, que sejam tolerantes a esses estresses ambientais (AGHAEI *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2008; ZHEN *et al.*, 2007; BOR *et al.*, 2003).

Apesar dos anos de pesquisas sobre o estudo do *deficit* hídrico em plantas superiores, os processos moleculares que são mais rapidamente afetados, como também os mecanismos iniciais da resposta molecular, ainda não estão bem compreendidos (SHINOSAKI & YAMAGUCHI-SHINOSAKI, 2007).

Sabe-se atualmente, que as inúmeras espécies vegetais apresentam enorme diversidade de mecanismos fisiológicos para adaptação à seca, apesar desses mecanismos ainda não serem completamente compreendidos (INGRAM & BARTELS, 1996). De certa forma, é sabido que a primeira etapa no disparo das respostas moleculares ocorre através da percepção do estresse e o subsequente repasse da informação por uma via de transdução de sinais. Estas vias, eventualmente, promovem mudanças fisiológicas, como o fechamento estomático, expressão gênica e modificações em processos celulares e moleculares. As vias que conduzem os estímulos da seca são interconectadas pelos estresses primários e pelas respostas conferidas (homeostase, desintoxicação e controle do crescimento). Dentre as vias de sinalização, destaca-se a via SOS como mediadora da homeostase iônica e tolerância ao Na⁺; a cascata de proteínas quinases (MAPK) mediadora da homeostase osmótica; e a cascata de proteínas do tipo LEA (*late embryogenesis activated*), responsáveis pelas vias que promovem a desintoxicação ou alívio dos danos oxidativos (ZHU, 2002).

A expressão protéica em uma célula é altamente dinâmica e a abundância e as atividades de proteínas específicas variam grandemente durante o desenvolvimento, crescimento e diferenciação, bem como em resposta a estresses bióticos e abióticos. Desta forma, é de grande interesse biológico a caracterização comparativa entre os proteomas de diferentes estágios de desenvolvimento das células, tecidos ou organismos, ou analisar de forma qualitativa ou quantitativa a ativação de vias metabólicas diversas (BAE *et al.*, 2003; MILLAR *et al.*, 2005; VAN, 2004; WU *et al.*, 2004; PAN *et al.*, 2005).

Os proteomas são compostos por vários milhares de proteínas e apresentam alta complexidade. No período de 1995 a 2000, o proteoma estrutural foi amplamente explorado, visando conhecer as proteínas expressas nas situações celulares de interesse. A partir de então, com o objetivo maior de auxiliar a genômica a caracterizar funcionalmente as proteínas correlacionadas a sistemas diversos, a chamada genômica funcional (RAPPSILBER & MANN, 2002), entra em evidência a proteômica funcional, como ferramenta para explorar grupos de peptídeos e proteínas de interesse específico

em rotas metabólicas, vias de sinalização, mecanismos de defesa e outros processos funcionais celulares. Embora muitos genes estudados tenham ainda funções desconhecidas, bases de dados de seqüências genômicas de organismos de interesse são necessárias para identificar e caracterizar proteínas por técnicas proteômicas (LEI *et al.*, 2005).

Modificações pós-transcricionais e pós-traducionais podem ser detectadas por técnicas de análise proteômica, que permitem a avaliação sistemática da expressão protéica comparativa em tecidos sob momentos fisiológicos diferentes, como tecidos doentes e sadios, tratados e não-tratados, resistentes e susceptíveis (THELEN, 2007). Num sentido mais amplo, a proteômica vai além da identificação de proteínas, abrangendo também a pesquisa de redes de interações protéicas avaliando a especificidade destas interações em microarranjos de proteínas (GAVIN *et al.*, 2002).

A eletroforese bidimensional (2D) associada à espectrometria de massas (MS) aplica-se principalmente ao estudo funcional comparativo da fisiologia celular, permitindo a identificação de proteínas já conhecidas, expressas em concentrações diferentes, por meio de análises de seu perfil peptídico (*Peptide Mass Fingerprinting*, PMF, JAMES *et al.*, 1993), que corresponde a um padrão de peptídeos obtidos após proteólise limitada sob dadas condições (DUNN & CORBET, 1996; MANN *et al.*, 2001; MÜLLER *et al.*, 2002; PANFILOV & LANE, 2002; HENZEL *et al.*, 2003). A eletroforese 2D é considerada o método de grande eficiência e sucesso na resolução de um proteoma, com altas reprodutibilidade e automação (WESTERMEIER & NAVEN, 2002). Entretanto, é necessário o uso criterioso e preciso da técnica para produzir géis 2D de qualidade e reprodutíveis, sendo esta, e o reduzido número de proteínas detectadas, as principais limitações da técnica. O conjunto das proteínas separadas no gel 2D dará origem a um mapa proteômico, que visa identificar a superexpressão ou a inibição da expressão de proteínas fisiologicamente relevantes nas condições analisadas, já que nem todas as proteínas são expressas simultaneamente nos sistemas vivos.

As proteínas diferencialmente expressas, separadas por eletroforese 2D, são identificadas por espectrometria de massas, sendo muito utilizados equipamentos do tipo MALDI-TOF, que determinam um padrão de massa molecular de peptídeos trípticos gerados a partir da proteína de interesse. O conjunto de massas moleculares obtidas é comparado com bancos de genes para proteínas traduzidas e clivadas *in silico*, ou comparados com bancos peptídicos obtidos à similaridade (*mass-fingerprinting*)

disponíveis mundialmente. Atualmente, com a evolução dos espectrômetros de massa, a técnica de *mass-fingerprinting* vem sendo complementada pelo seqüenciamento da extremidade amino-terminal (N-terminal) ou de todo o peptídeo gerado, comumente em equipamentos designados MALDI-TOF-TOF ou equipamentos MS/MS ou MSⁿ.

Devido à importância econômica da soja, alguns grupos já começaram a estudar o seu proteoma (MOONEY & THELEN, 2004; HAJDUCH *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2006; BATISTA *et al.*, 2007; NATARAJAN *et al.*, 2007; KRISHNAN *et al.*, 2007). Por exemplo, Hajduch *et al.* (2005) determinaram o padrão de expressão e a identidade de centenas de proteínas que são sintetizadas durante o enchimento da semente de soja. Isso levou ao estabelecimento de mapas proteômicos de alta resolução para a cultura. As proteínas foram classificadas em 14 categorias funcionais, permitindo uma rápida correlação entre as proteínas identificadas e o seu papel fisiológico na planta. Os dados obtidos são disponibilizados através de um banco de dados da Universidade de Missouri (<http://oilseedproteomics.missouri.edu>).

Diferenças entre condições fisiológicas são refletidas em mudanças na expressão gênica, as quais podem ocorrer por variações no nível de transcritos ou de proteínas. A proteômica provê informações complementares àquelas obtidas pela transcriptômica, uma vez que esta última somente fornece dados sobre a expressão gênica até o nível de transcrição (LOCKHART & WINZELER, 2000; PANDEY, 2000). Em conjunto, podemos afirmar que a análise proteômica é um instrumento poderoso para estudar os mecanismos de tolerância à seca em soja.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal, condução do experimento e delineamento experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com temperatura ambiente de $30 \pm 5^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 20\%$.

As sementes de soja dos cultivares Embrapa 48 (genótipo tolerante ao *deficit* hídrico) e BRS 16 (genótipo sensível ao *deficit* hídrico), cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária - EMBRAPA SOJA de Londrina, Paraná, foram

germinadas em areia lavada, onde permaneceram por cerca de 10 dias. Em seguida, 80 plântulas de cada genótipo foram transplantadas – duas a duas – para vasos de 10 litros contendo solo com adubação natural com esterco bovino curtido (30% areia, 40% solo vermelho amarelo, 30% esterco bovino). Quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento V4 (FEHR & CAVINESS, 1977) ou período de pré-floração, foram iniciados os tratamentos.

As plantas, ao atingirem o estágio de desenvolvimento V4, foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle) ou submetidas a *deficit* hídrico, imposto pela suspensão da irrigação, até propiciar um potencial hídrico do solo ou foliar na antemanhã (Ψ_{am}) de $-1,0 \pm 0,1$ MPa e $-1,5 \pm 0,1$ MPa, valores que caracterizam uma condição de estresse moderado e severo para plantas de soja, respectivamente.

O potencial hídrico foliar foi monitoramento diariamente a partir do quinto dia de imposição do *deficit*, sempre entre 05:00h e 06:00h da manhã, utilizando folhas completamente expandidas do quarto ou quinto trifólio a partir do ápice, por meio de uma bomba de pressão do tipo Scholander (SCHOLANDER *et al.*, 1965).

Por ocasião da coleta, as folhas de soja foram acondicionadas em envelopes de papel aluminizado, congeladas com nitrogênio líquido, e armazenadas a -80°C , para serem usadas para o preparo dos extratos protéicos, ensaios enzimáticos e demais avaliações.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), num arranjo fatorial 3x2, com o primeiro fator correspondendo aos potenciais hídricos das plantas e o segundo aos genótipos contrastantes, com 7 repetições e 2 plantas por parcela. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), sendo posteriormente aplicado um teste de médias, Tukey a 5% de probabilidade utilizando o software Estat®.

3.2 Caracterização das respostas fisiológicas

Ambos os cultivares, durante o experimento de estresse hídrico, tiveram as seguintes variáveis determinadas:

3.2.1 Potencial hídrico foliar;

Foram realizadas medições diárias do potencial hídrico foliar a partir do terceiro dia de imposição do *deficit* sempre entre 05:00h e 06:00h da manhã em folhas completamente expandidas do quarto ou quinto trifólio a partir do ápice, por meio de uma bomba de pressão do tipo Scholander (SCHOLANDER *et al.*, 1965).

3.2.2 Trocas gasosas;

A taxa de assimilação líquida do CO₂ (A), a condutância estomática ao vapor d'água (g_s), a taxa transpiratória (E) e razão interna e externa de carbono (razão C_i/C_a) foram determinadas entre 08:00h e 09:00h, por intermédio de um analisador de gases a infravermelho portátil (LCpro+, ADC, Kings Lynn, Reino Unido) em sistema aberto, sob intensidade de fluxo fotônico de 1000 $\mu\text{mol de f\u00f3tons.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e concentração ambiente de CO₂. A eficiência intrínseca do uso da água foi calculada pela razão A/E .

3.2.3 Parâmetros de fluorescência

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram medidos nas mesmas folhas utilizadas para medições de trocas gasosas por meio de um fluorômetro com amplitude de pulso modulado (PEA, Hansatech, Norfolk, Reino Unido), segundo Schreiber *et al.* (1994). Após serem adaptados ao escuro por 30 min., os tecidos foliares foram inicialmente expostos a um fraco pulso de luz vermelho-distante ($1\text{-}2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), para determinação da fluorescência inicial (F_0). Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de 6000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e duração de 1s, foi aplicado para estimar-se a fluorescência máxima emitida (F_m). A eficiência máxima do fotossistema II (PSII) foi estimada pela razão entre as fluorescências variável e máxima, $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$.

Subseqüentemente, as folhas foram irradiadas com luz actínica durante 300s à irradiância de 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, para a obtenção da fluorescência constante (F_s). Em seguida, outro pulso de luz saturante foi aplicado, por 1s, para obtenção da fluorescência máxima emitida pelas amostras na presença de luz (F_m'). A luz actínica foi então desligada e as amostras foram irradiadas com luz vermelho-distante, para a obtenção da F_0 adaptada à luz (F_0'). A eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos do PSII foi estimada por $F_v'/F_m' = (F_m' - F_0')/F_m'$. O coeficiente de extinção fotoquímico foi calculado como $qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$, e o de extinção não-fotoquímico por $NPQ = (F_m/F_m') - 1$. O rendimento quântico do transporte de

elétrons do PSII foi estimado como $\phi_{PSII} = (Fm' - F_s) / Fm'$. A fração da energia absorvida pelo complexo-antena associado ao FSII não utilizada na fotoquímica, nem dissipada termicamente, foi estimada como $P_E = (F_v' / F_m') \times (1 - q_p)$. A taxa de transporte de elétrons foi calculada segundo a fórmula $ETR = \Phi_{FSII} \times 0,5 \times FFF \times A_L$, onde A_L é a absorbância luminosa para soja, e FFF é a intensidade de fluxo fotônico 1000 μmol de fótons. $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, e 0,5 a fração de energia distribuída para o PSII.

3.2.4 Determinação de pigmentos cloroplastídicos

Os teores de pigmentos (clorofilas *a*, *b*, totais e carotenóides) foram determinados utilizando extração com dimetilsulfóxido puro (DMSO) e saturado com carbonato de cálcio (CaCO_3), conforme descrito por Welburn (1994). Um disco foliar de 1,4 cm de diâmetro foi colocado em tubos contendo 1mL de DMSO saturado com CaCO_3 e mantidos no escuro a 65 °C. Após uma hora, as absorbâncias dos extratos foram lidas em leitor de placa de ELISA (ASYS, UVM-340, Australia) a 480; 649,1 e 665,1nm, utilizando somente, como branco, a mesma solução de DMSO puro. Os teores de pigmentos foram expressos em $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$ de tecido foliar.

3.2.5 Determinação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi quantificada através da determinação de aldeído malônico (MDA) formado de acordo com Gomes Junior (2006) e Hoedges (1999). Cinco discos foliares (150 mg) foram macerados em nitrogênio líquido na presença de 10% (p/p) de polivinilpolipirrolidona (PVPP), em seguida foi adicionado 2,0 mL da solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. As amostras foram centrifugadas a 10000 *g* por 15 minutos a 4 °C. 250 μL do extrato sobrenadante foram adicionados a 1,0 mL da solução de TCA 20% (p/v) contendo 0,5% (p/v) de ácido tiobarbitúrico (+TBA). Como controle negativo, outros 250 μL do extrato foram adicionados a 1,0 mL da solução de TCA 20% sem ácido tiobarbitúrico (-TBA). As amostras foram misturadas vigorosamente e incubadas a 95 °C por 30 minutos, com a reação paralisada no gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 *g* por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para leituras de absorbância a 440, 532 e 600nm, segundo Hodges *et al* (1999). A concentração de MDA foi expressa em $\text{nmol g}^{-1} \text{MF}$.

3.2.6 Determinação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo

As atividades das enzimas do sistema antioxidante: superóxido dismutase (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidases totais (POX) e catalase (CAT) foram determinadas em discos foliares acondicionados em microtubos congelados em nitrogênio líquido utilizando-se um moinho de esferas pré-resfriado, onde foi adicionado 10 % (p/p) de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e 2 mL de meio de extração (Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/V); PEIXOTO *et al.*, 1999). O homogenato resultante foi centrifugado a 15000 *g*, por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e usado para quantificação protéica (BRADFORD, 1976) e determinação das atividades enzimáticas.

A atividade total da SOD foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Giannopolitis & Ries (1977), em que a atividade da SOD é dada pela capacidade da enzima em inibir a redução fotoquímica do azul de nitrotetrazólio (NBT) sob luz. Para os ensaios de atividade, uma alíquota do extrato enzimático (5 µL) foi aplicada a 250 µL (volume final) de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 52,5 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM, metionina 13 mM (pH 7,8) e riboflavina 2 µM. A interferência inespecífica inerente ao extrato adicionado ao ensaio enzimático foi determinada pela adição de extrato desnaturado à mistura de reação, enquanto que a produção total de azul de formazana foi determinada utilizando-se apenas o meio de reação. O ensaio de atividade foi iniciado pela exposição dos tubos contendo as referidas misturas a uma câmara contendo luz fluorescente (15 W), a 25 °C, por 10 min. A reação foi paralisada desligando-se a luz, sendo a produção fotoquímica de azul de formazana determinada em leitor de placa de ELISA (ASYS, UVM-340, Australia), a 560 nm. Uma mistura de reação mantida sob obscuridade foi utilizada como branco. A atividade da SOD (unidades mL⁻¹) foi proporcional à relação $V/v - 1$, em que *V* é a variação em absorbância por minuto, sem o extrato enzimático, e *v* é a variação em absorbância por minuto, com o extrato. Considerou-se que 1 U de SOD corresponde à quantidade da enzima capaz de inibir a redução do NBT em 50%.

A atividade da APX foi determinada de acordo com Nakano & Asada (1981), com algumas modificações. O ensaio enzimático foi realizado em espectrofotômetro, após a adição de 10 µL de extrato enzimático a 740 µL de meio de reação contendo

tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), ascorbato 0,5 mM e H₂O₂ 0,1 mM. A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 290 nm, durante 1 min, a 25 °C. Para os cálculos da atividade, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do ascorbato (2,8 mM⁻¹ cm⁻¹), e o resultado final expresso em μmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

A atividade da POX foi determinada de acordo com Kar & Mishra (1976), com algumas modificações. O ensaio enzimático foi realizado em espectrofotômetro, após a adição de 10 μL de extrato enzimático a 740 μL de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirrogallol 20 mM e H₂O₂ 20 mM. A atividade da enzima foi determinada pelo acréscimo na absorbância a 420 nm, durante 1 min, a 25°C. Para os cálculos da atividade, utilizou-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹, e o resultado final expresso em μmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

A atividade da CAT foi determinada pelo consumo de H₂O₂, de acordo com Havir & McHale (1987), com algumas modificações. O ensaio enzimático foi realizado em espectrofotômetro, após a adição de 10 μL de extrato enzimático a 740 μL de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) e H₂O₂ 12,5 mM. A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240nm, durante 1 min, a 30 °C. Para os cálculos da atividade, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ (39,4 mM⁻¹ cm⁻¹), e o resultado final expresso em μmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

3.3 Extração de proteínas totais de folhas de soja

Para extração das proteínas de folhas de soja foi utilizado o protocolo descrito por Shen (2002), com modificações (MESQUITA *et al.*, 2009; Figura 1). Folhas de soja foram pulverizadas em almofariz pré-resfriado com nitrogênio líquido. O tecido pulverizado (aproximadamente 1,5 g) juntamente com 10% (p/V) de polivinilpolipirrolidona (PVPP) foi ressuspenso e solubilizado por 2 h a 4°C em 10 mL de tampão de extração (Tris HCl pH 7,5 40 mM; sacarose 250 mM; EDTA 10 mM; TritonX 100 1%; DTT 1mM; PMSF 1mM; 2-mercaptoetanol 2%). Após centrifugação a 6000 g por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi coletado e o precipitado foi lavado uma vez com cinco mL de tampão de extração e o sobrenadante coletado juntamente com o primeiro. Em seguida, as proteínas foram precipitadas pela adição ao sobrenadante de 15 mL de TCA 10% em acetona gelada. Após 12 horas a -20 °C, a mistura foi centrifugada a 6000 g por 15 min e o precipitado lavado (3-4 vezes) com acetona gelada

até clarificação do sedimento. O excesso de acetona foi removido com uma lavagem com etanol 80%. O precipitado final foi então seco, dissolvido em tampão de amostra para gel bidimensional (uréia 7M, Tiourea 2M, CHAPS 4%, IPG-buffer 2%, DTT 80 mM), e sonicado por três vezes por 1 minuto no gelo. A concentração protéica foi determinada nas amostras de acordo com o método de Bradford (1976). As amostras foram armazenadas a -20°C até posterior análise.

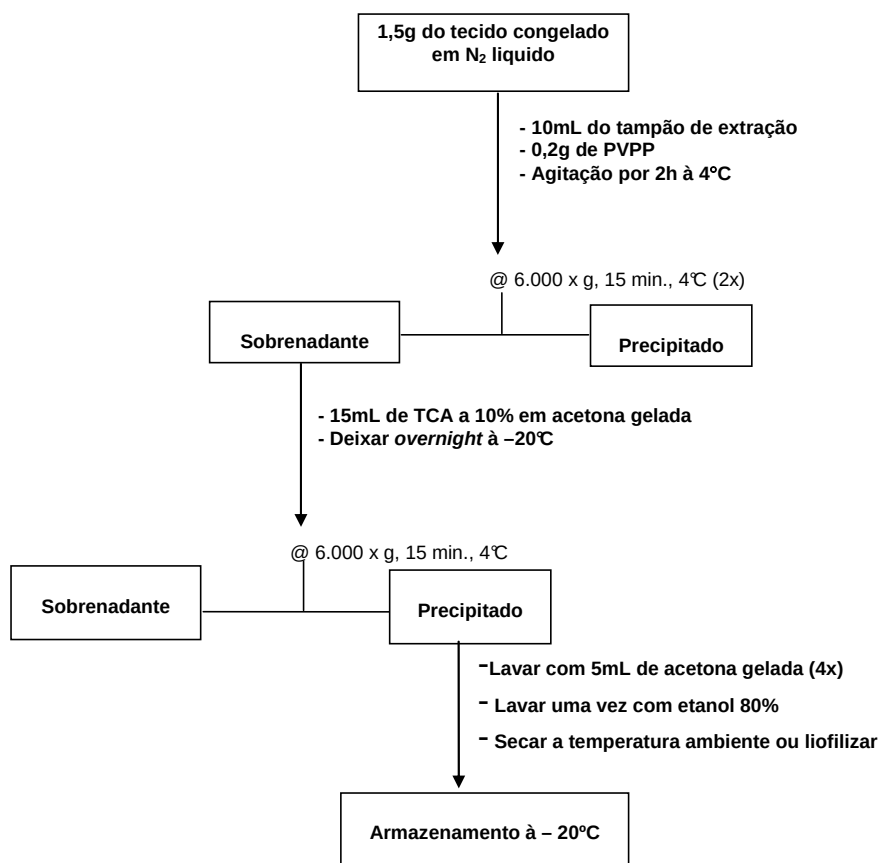


Figura 1. **Modelo esquemático do método de extração utilizado nesse estudo.** Modelo proposto por Shen (2002) e modificado por Mesquita *et al.*, (2009).

3.4 SDS-PAGE – 1D

Foram feitas análises de pureza das amostras e presença de degradação em gel SDS-PAGE de acordo com Laemmli (1970). As amostras protéicas foram desnaturadas a 95°C por 5 min e aplicadas em gel SDS-PAGE 12% (40 µg de proteína por poço). Os géis foram corados com *Coomassie* coloidal.

3.5 Separação das proteínas solúveis em géis bidimensionais

No gel bidimensional, a primeira dimensão ou focalização isoeétrica (IEF) foi realizada em fitas de 24 cm com gradientes de anfólinos entre o pH 4–7 (GE Healthcare Upsala, Suécia). Inicialmente, as fitas foram reidratadas por 14-20 h em 450µl de tampão de reidratação (urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 2%, azul de bromofenol 0,002%, IPG buffer 2%, DTT 0,2%) contendo 1mg de proteína das amostras. A Focalização Isoelétrica (IEF) foi realizada em um sistema *IPGphor* (GE Healthcare Upsala, Suécia) a 20°C: 0,5 kVh a 500 V, 0,8 kVh a 1000 V, 13,5 kVh a 8000 V e 40 kVh a 8000 V. Para a análise da segunda dimensão, as fitas foram equilibradas duas vezes individualmente por 15 min em 5 mL de solução de equilíbrio (urea 6M, glycerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%, Tris-HCl 50 mM pH 8.8) contendo 1% de DTT e 2,5% de iodoacetamida, respectivamente. A separação da segunda dimensão foi realizada no aparelho *PROTEAN DaltSIX* (GE Healthcare Upsala, Suécia) com espaçadores de 1,0 mm em gel de poliacrilamida 12,5%. As condições da eletroforese foram de 30 min a 15 mA, seguida de 6 h a 30 mA. Para os experimentos de 2D/SDS-PAGE foram utilizadas quatro réplicas biológicas para confirmar a reprodutibilidade, e permitir a análise estatística das diferenças nas análises densitométricas das imagens. Adicionalmente, foi também considerado como critério de seleção, somente o “spot” diferencialmente expresso que detectado em pelo menos 3 géis.

3.6 Visualização das proteínas e análise da imagem após digitalização dos géis bidimensionais

Os géis foram corados pela técnica de *Coomassie* coloidal. Primeiramente, os géis foram fixados em solução contendo ácido acético 10% e etanol 40% (*overnight*). Em seguida, foram lavados com água ultra pura (MilliQ) por 30 segundos, para a remoção da solução de fixação, sendo, então, corados pela adição de azul de *Coomassie* G-250 coloidal a 0,02% por 72 h e mantidos em solução de ácido acético 2% até a digitalização.

As imagens dos géis foram digitalizadas utilizando um scanner *ImageScanner II* (GE Healthcare, Upsala, Suécia) e calibradas com o programa *Labscan* (GE Healthcare,

Upsala, Suécia) As análises das imagens digitalizadas de cada gel foram realizadas no programa *ImageMaster 2D platinum* (GE Healthcare, Upsala, Suécia). As massas moleculares das proteínas foram determinadas utilizando padrões de massa molecular (GE Healthcare, Upsala, Suécia) presentes em cada gel. Para obter dados sobre a expressão de proteínas, as manchas de proteínas coradas (ou “spots”) foram normalizadas quanto ao volume relativo, definido como o volume individual de cada “spot” dividido pela soma do volume de todos os “spots”. Os “spots” coincidentes em função da sua posição no gel foram pareados automaticamente, a partir de proteínas marcadoras da posição do gel (*landmarks*). Apesar do pareamento automático, todos os pares foram verificados manualmente ao final e, alguns ajustes foram realizados nos cálculos automáticos feitos pelo programa citado. Foram consideradas proteínas diferencialmente expressas aquelas que apresentaram uma variação na porcentagem de volume entre os tratamentos de 1,5 vezes ou mais (média de quatro géis), contendo proteínas oriundas de extrações e réplicas biológicas independentes. Com diferença estatisticamente significativa segundo teste t ($p \leq 0.05$).

3.7 Digestão trípica

Os “spots” excisados dos géis foram transferidos para microtubos de 0,2 mL e digeridos com tripsina. A digestão foi realizada segundo protocolo de digestão trípica estabelecido por Shevchenko (2006), onde os pedaços de géis excisados foram descorados em 3 lavagens com solução de acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,0. Após a segunda lavagem, foram incubados com reação de digestão por 12 horas (*overnight*) sob agitação constante, e depois procedeu-se a terceira lavagem, da mesma forma que as anteriores, com 200 μ L de acetonitrila (100%). Posteriormente à remoção da acetonitrila, os fragmentos de géis foram secados a vácuo por 15 minutos. Os pedaços de gel foram reduzidos em 100 μ L de DTT 65 mM por 30 minutos, à temperatura de 56 °C. Posteriormente, foram alquilados com 100 μ L de iodoacetamida 200 mM, por 30 min à temperatura ambiente, lavados com solução de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 min e desidratados com 200 μ L de acetonitrila por 5 minutos. A acetonitrila foi removida e feita nova reidratação com 200 μ L de bicarbonato de amônio 100 mM, seguido de duas etapas de desidratação com 200 μ L de acetonitrila 100%. Após remoção da solução de acetonitrila, os géis foram secos a vácuo por 15 minutos.

Foram adicionados 15 μL de uma solução de tripsina Gold Mass (Promega) $25\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ por 45 minutos no gelo. Em seguida, foi adicionado uma solução de 50 μL de bicarbonato de amônio 40 mM em acetonitrila 10%, *overnight* a 37 °C. As amostras constituídas de peptídeos obtidos por digestão trípica foram purificadas e desalinizadas utilizando ponteiras de 0,6 μL ZipTip® com resina C_{18} (Millipore) segundo o protocolo do fabricante. Primeiramente, as ponteiras ZipTip® C_{18} foram ativadas com uma solução de acetonitrila 100% , usando o volume máximo de 10 μL da ponteira, certificando-se de que foram feitas 10 lavagens, dispensando sempre a solução após cada lavagem. Após a etapa de ativação, as ponteiras foram equilibradas com solução de ácido trifluoacético 0,1%, aspirando e dispensando a solução cerca de 10 vezes. Após a etapa de equilíbrio, as ponteiras foram carregadas com amostra, aspirando pelo menos 10 vezes a amostra na resina. Após o carregamento, as ponteiras foram lavadas com solução de ácido trifluoacético 0,1%, aspirando e dispensando a solução cerca de 10 vezes. Em um microtubo contendo 2,0 μL de uma solução de acetonitrila 50% em ácido trifluoroacético 0,1%, os peptídeos foram eluídos aspirando e dispensando a amostra 10 vezes dentro do mesmo microtubo.

3.8 Análise por espectrometria de massa

As amostras foram aplicadas em placa de MALDI na proporção 1:1 de amostra e matriz (ácido α -ciano-4-hidrocinâmico) em 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético. Os fragmentos resultantes da digestão trípica foram analisados no intervalo de 500–3500 Da no instrumento ULTRAFLEX III MALDI-TOF-TOF (BRUKER *Daltonics*) no modo MS reflectivo positivo, com intervalo de tolerância monoisotópica de 0,2 Da/0,6 Da. Os peptídeos foram identificados usando o método de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF). Os espectros MS gerados foram confrontados contra o banco de dados NCBI-Nr (*National Center for Biotechnology Information- Non redundant*) contidos no programa Mascot 4®, sendo que proteínas com espectros com valor do índice iônico (*ion score*) menor que 40 foram considerados com identificação não validada ou abaixo do nível de confiabilidade, e então não consideradas como proteínas identificadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Potencial hídrico

Nas plantas controle de ambos os cultivares de soja (BRS 16 – sensível e Embrapa 48 – tolerante), o potencial hídrico de antemanhã (ψ_{am}) foi sempre superior a -0,2 MPa. Após a suspensão da irrigação, a partir do terceiro dia foi observada uma diferença de potencial hídrico entre as plantas controle e tratadas, com uma redução progressiva do ψ_{am} das plantas submetidas ao *deficit* hídrico no decorrer dos dias, sendo essa diminuição mais acelerada no BRS 16 (Tukey, $p \leq 0,05$) (Figura 2).

As plantas do cultivar BRS 16 (sensível à seca) alcançaram o ψ_{am} em torno de -1,0 e -1,5MPa por volta do quinto e sétimo dia após a suspensão da irrigação, respectivamente. Por outro lado, as plantas do cultivar Embrapa 48 (tolerante à seca) demandaram um tempo maior para atingir os mesmos níveis de ψ_{am} , cerca de sete e nove dias, respectivamente (Figura 2). Estes resultados são consistentes com uma melhor economia hídrica no cultivar Embrapa 48 (tolerante).

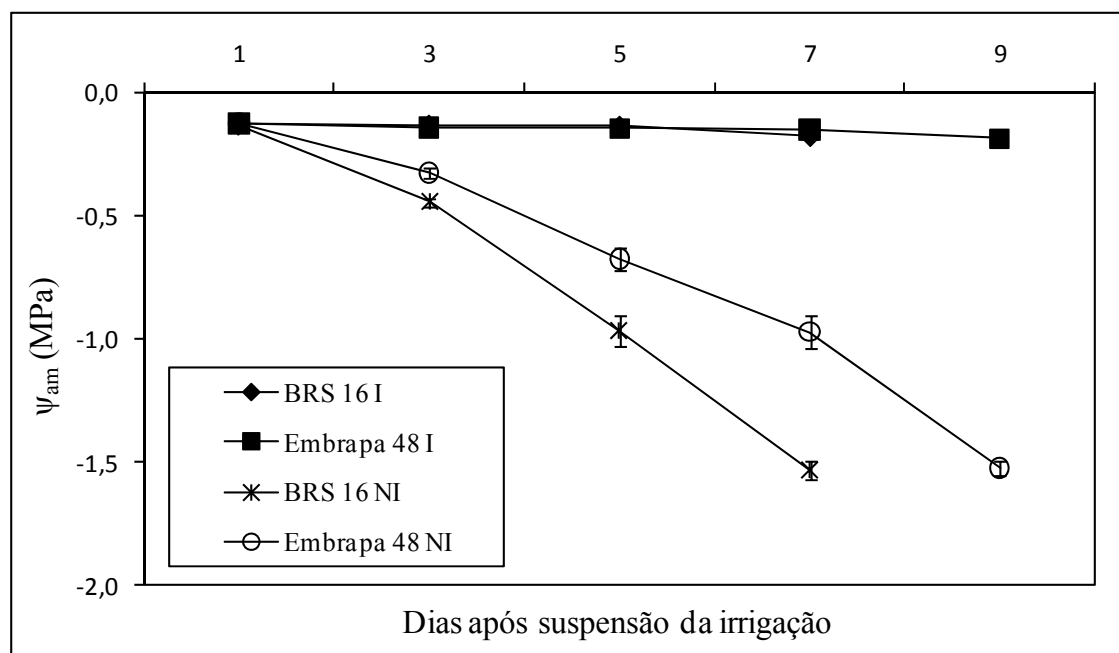


Figura 2. Perfil temporal do potencial hídrico foliar na antemanhã (ψ_{am}) em cultivares de soja. Cultivar sensível ao *deficit* hídrico (BRS 16) e cultivar tolerante ao *deficit* hídrico (Embrapa 48), sob condições irrigadas (símbolos cheios) e sob condição de suspensão de irrigação (símbolos vazios). Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão ($n=5$, onde n representa o numero de plantas. I = irrigado, NI = não-irrigado (não irrigado após imposição do estresse).

Na Figura 3, observa-se o aspecto das plantas dos dois cultivares ao final do experimento. As plantas do BRS 16 (Figura 3 A), apresentavam-se mais debilitadas nos *deficits* moderado (-1,0 MPa) e severo (-1,5 MPa) em comparação com as plantas do Embrapa 48 nos mesmos níveis de *deficit* (Figura 2B). Além disso, os potenciais hídricos de -1,0 MPa (*deficit* moderado) e -1,5 MPa (*deficit* severo) foram alcançados mais rapidamente pelo BRS 16 (sensível).

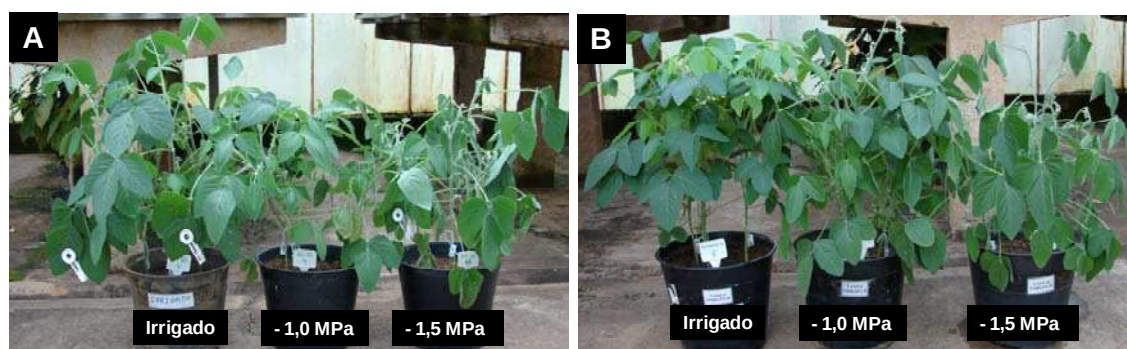


Figura 3. **Visão geral das plantas no final do experimento.** (A) Plantas do cultivar BRS 16 nos três níveis de irrigação; (B) Plantas do cultivar Embrapa 48 nos três níveis de irrigação.

4.2 Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência da clorofila *a*

Na ausência de estresse, a taxa fotossintética líquida (*A*) foi maior no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao cultivar sensível (BRS 16), sendo, respectivamente, 16,9 e 13,8 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$, e sempre menores, em ambos na presença de estresse (Figura 4 A). Entretanto, neste mesmo tratamento, as diferenças na condutância estomática foram opostas, sendo maiores no cultivar sensível (Figura 4 B). Reduções significativas na fotossíntese foram claramente detectadas em qualquer nível de estresse, e foram progressivas com o aumento do nível de estresse (Figura 4 A). Sob estresse moderado, a fotossíntese foi maior no cultivar tolerante, embora não fosse detectada diferença em *g_s* e na razão *C_i/C_a* entre os cultivares (Figuras 4 A, B e D). Sob estresse severo, os efeitos foram diferentes: não houve diferença na fotossíntese, ainda que o cultivar tolerante tenha apresentado menor condutância estomática, e maior razão *C_i/C_a* (Figuras 4 A, B e D). As taxas transpiratórias (*E*) foram reduzidas em ambos os cultivares quando da imposição do *deficit* hídrico (Figura 4 C). A redução proporcional da transpiração sob estresse hídrico progressivo sempre foi menor no cultivar tolerante, contribuindo para que o mesmo tenha tido, em todos os tratamentos, sempre um maior nível de eficiência do uso da água (Figura 4 E).

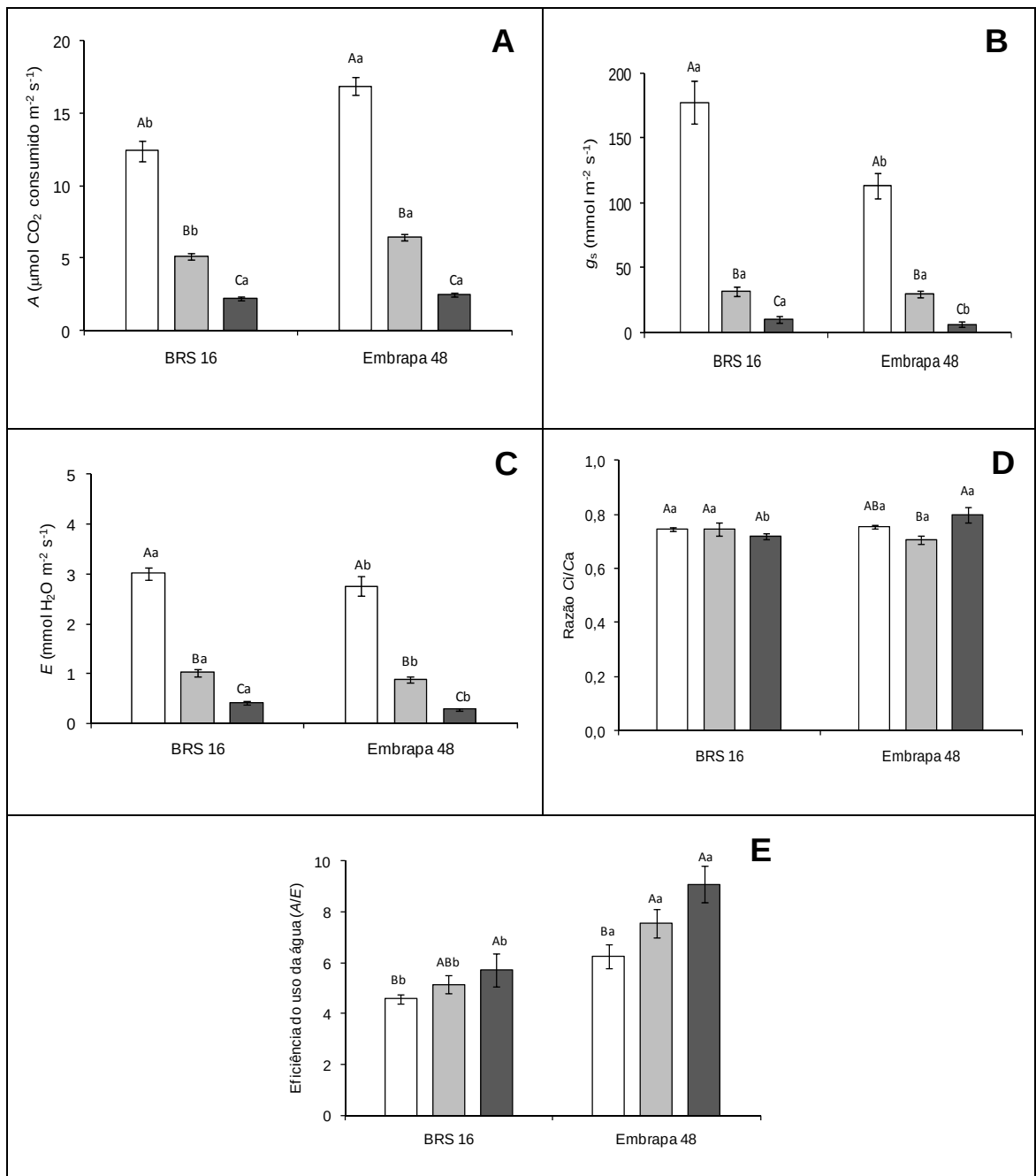


Figura 4. Efeito do *deficit* hídrico sobre a taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (B), taxa transpiratória (C), razão C_i/C_a (D) e eficiência do uso da água (E) em cultivares sensível (BRS 16) e tolerante ao *deficit* hídrico (Embrapa 48). Barras brancas correspondem à média das plantas irrigadas, enquanto barras cinzas e pretas correspondem, respectivamente, a plantas submetidas ao estresse hídrico moderado (-1,0 MPa) e severo (-1,5 MPa). Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias dentro de um mesmo cultivar, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento em cultivares diferentes, (Tukey, $p \leq 0,05$). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão ($n=7$).

Na presença de estresse hídrico, a taxa de transporte de elétrons (ETR) foi reduzida de forma proporcional com o nível de estresse em ambos os cultivares (Figura

5). Sob *deficit* hídrico moderado, o cultivar sensível (BRS 16) apresentou um declínio da *ETR* significativamente menor (23%) que o cultivar tolerante (35%), o que também foi observado sob *deficit* hídrico severo, (39% e 48%, respectivamente).

Uma observação importante é o fato de g_s apresentar valores absolutos menores no cultivar tolerante e ainda A maior, sugerindo que existe uma percepção mais rápida do estresse por este cultivar e esse fato poderia ajudar no processo de tolerância, por minimizar a perda de água. Conforme foi sendo estabelecido o *deficit* hídrico, a condutância estomática foi se reduzindo gradativamente, assim como a taxa fotossintética líquida, refletindo em valores constantes na razão C_i/C_a entre condições irrigadas e de *deficit* hídrico (Figura 4D). Na ausência de estresse e sob *deficit* hídrico moderado, houve um paralelismo entre a redução da fotossíntese líquida e a taxa de transporte de elétrons, mostrando sempre o cultivar tolerante as maiores taxas (Figura 5).

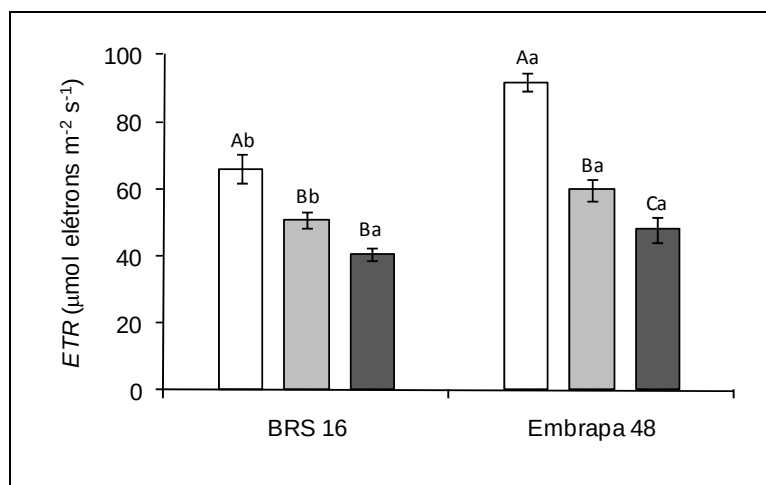


Figura 5. Efeito do *deficit* hídrico sobre a taxa de transporte de elétrons em cultivares de soja em cultivares sensível (BRS16) e tolerante ao *deficit* hídrico (Embrapa48). Barras brancas correspondem à média das plantas irrigadas, enquanto barras cinzas e pretas correspondem, respectivamente, a plantas submetidas ao estresse hídrico moderado (-1,0 MPa) e severo (-1,5 MPa). Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias dentro de um mesmo cultivar, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento em cultivares diferentes, (Tukey, $p \leq 0,05$). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão ($n=7$).

Apesar da taxa fotossintética líquida (A) ter reduzido em decorrência do *deficit* hídrico, não houve fotoinibição, visto que a eficiência fotoquímica (razão F_v/F_m)

permaneceu inalterada (Figura 6), permanecendo similar às plantas controle, em ambos os cultivares, evidenciando a ausência de fotoinibição.

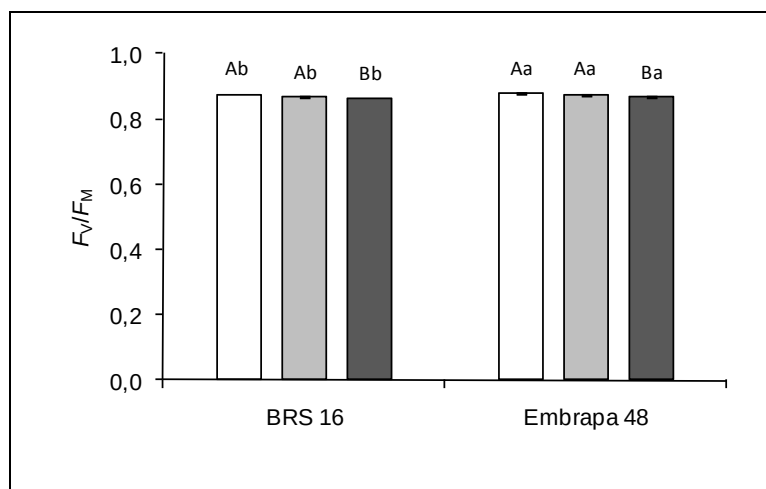


Figura 6. Efeito do *deficit* hídrico sobre a razão F_v/F_m em cultivares de soja sensível (BRS16) e tolerante ao *deficit* hídrico (Embrapa48). Barras brancas correspondem à média das plantas irrigadas, enquanto barras cinzas e pretas correspondem, respectivamente, a plantas submetidas ao estresse hídrico moderado (-1,0 MPa) e severo (-1,5 MPa). Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias dentro de um mesmo cultivar, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento em cultivares diferentes, (Tukey, $p \leq 0,05$). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão (n=7).

Nas medições realizadas as 08:00h, o cultivar tolerante Embrapa 48 apresentou diferença significativa no rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\square$ FSII) em relação ao cultivar sensível BRS 16, tanto na condição irrigada quanto sob *deficit* moderado (Figura 7 A). Já sob *deficit* severo, não houve diferença entre os cultivares. Essa redução no $\square$ FSII no cultivar sensível reflete a redução na taxa de assimilação líquida de carbono (Figura 4 A), provavelmente devido à baixa disponibilidade de CO_2 em consequência da diminuição da condutância estomática (Figura 4 B). Com relação ao coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ), não houve diferenças tanto entre os diferentes cultivares, quanto nos tratamentos dentro de cada cultivar (Figura 7B). Já para a fração de luz absorvida que é utilizada na fase fotoquímica do FSII (P), o cultivar tolerante (Embrapa 48) apresentou maiores valores em relação ao cultivar sensível (BRS 16), tanto em condições irrigadas quanto sob *deficit* moderado (Figura 7C), de forma semelhante a observada para a taxa de fotossíntese líquida (A) e de transporte de elétrons (ETR).

É importante ressaltar que o cultivar tolerante, além de apresentar maiores valores de P, também apresentou maior capacidade de fixação de CO₂ em relação ao cultivar sensível BRS 16, tanto em condição irrigada quanto sob *deficit* moderado (Figura 4A). Quando sob condições de *deficit* hídrico, ambos os cultivares apresentaram um aumento na fração de luz absorvida que não é dissipada termicamente e nem utilizada na fase fotoquímica do FSII (P_E). Entretanto, não foi observada diferença em P_E entre os cultivares tolerante e sensível (Figura 7 D). Analisando a fração de luz absorvida que é dissipada termicamente (D), observa-se que o cultivar tolerante Embrapa 48 apresentou menores valores de D, quando comparados ao cultivar sensível BRS 16, tanto em condições irrigadas, quanto sob *deficit* (Figura 7 E). Os tratamentos em ambos os cultivares não diferiram estatisticamente entre si em D (Figura 7 E).

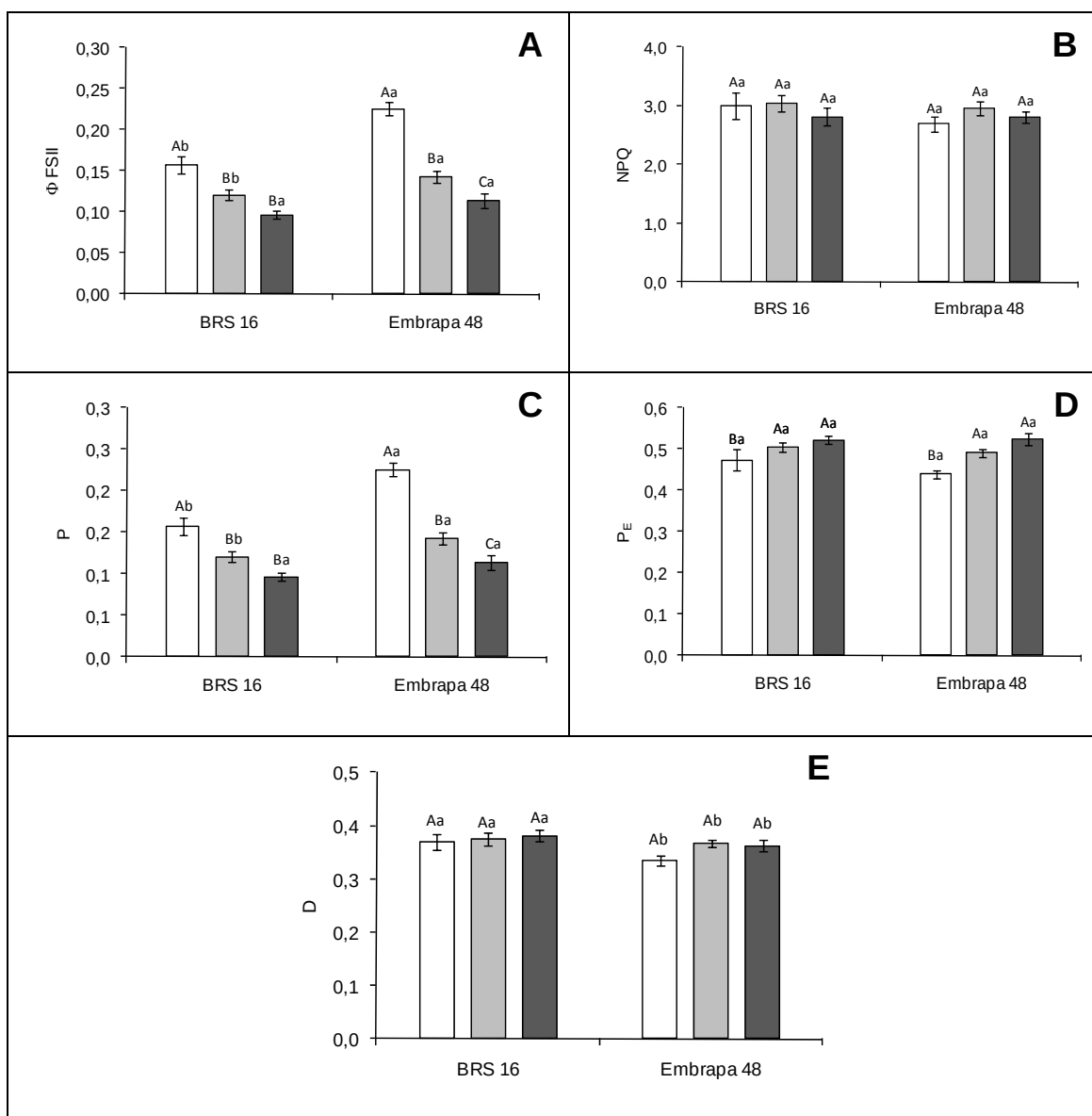


Figura 7. Efeito do *deficit* hídrico sobre o Φ FSII – rendimento quântico efetivo do FSII (A), NPQ – coeficiente de extinção não fotoquímico (B), P – fração da luz absorvida que é utilizada na fase fotoquímica do FSII (C), P_E – fração da luz absorvida que não é dissipada termicamente e nem utilizada na fase fotoquímica do FSII (D) e D – fração de luz absorvida que é dissipada termicamente (E) em cultivares de soja. Barras brancas correspondem à média das plantas irrigadas, enquanto barras cinzas e pretas correspondem, respectivamente, a plantas submetidas ao estresse hídrico moderado (-1,0 MPa) e severo (-1,5 MPa). Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias dentro de um mesmo cultivar, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento em cultivares diferentes, (Tukey, $p \leq 0,05$). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão (n=7).

4.3 Danos celulares e atividade enzimática

Os danos celulares foram avaliados pela peroxidação lipídica através da quantificação de aldeído malônico (MDA).

A peroxidação lipídica aumentou em ambos os cultivares sob condições de *deficit* hídrico moderado e severo em comparação com os grupos controle (irrigado) de cada cultivar (Figura 8). O cultivar sensível (BRS 16) apresentou valores absolutos superiores ao tolerante (Embrapa 48) em todos os regimes hídricos (Figura 8), indicando uma menor capacidade antioxidativa do cultivar sensível.

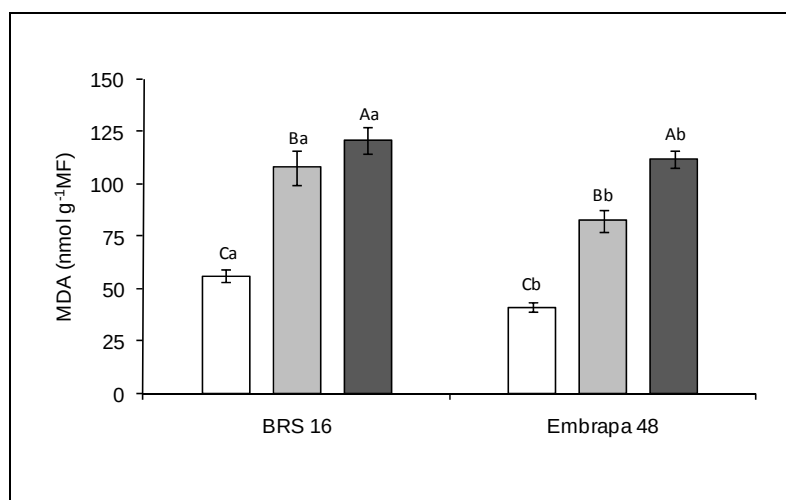


Figura 8. Efeito do *deficit* hídrico sobre a peroxidação de lipídeos expressas em concentrações foliares de aldeído malônico (MDA) em cultivares de soja. Barras brancas correspondem à média das plantas irrigadas, enquanto barras cinzas e pretas correspondem, respectivamente, a plantas submetidas ao estresse hídrico moderado (-1,0 MPa) e severo (-1,5 MPa). Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias dentro de um mesmo cultivar, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento em cultivares diferentes, (Tukey, $p \leq 0,05$). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão (n=7).

A peroxidação de lipídeos gera o aldeído malônico (MDA), que é um produto da decomposição de ácidos graxos das biomembranas e é uma forma de atestar a presença de radicais livres (LIN & KAO, 2000; MUNNÉ-BOSCH *et al.*, 2002).

A maior peroxidação lipídica observada no cultivar sensível (BRS 16) quando comparada ao cultivar tolerante é condizente com os dados de atividade fotossintética, uma vez que as plantas do cultivar tolerante apresentaram atividade fotossintética superior, o que requer maior integridade de membranas. Soares (2008), trabalhando com *deficit* hídrico em *Coffea canephora* em dois cultivars, tolerante (120) e sensível (109A), encontrou o mesmo comportamento para acúmulo de aldeído malônico do presente estudo, onde o cultivar tolerante apresentou peroxidação lipídica significativamente menor, comparadas as mesmas condições no cultivar sensível. Portanto, os resultados encontrados para peroxidação lipídica sugerem que um aumento nos processos oxidativos deve ter ocorrido no cultivar sensível (BRS 16).

Sob *deficit* hídrico, o aparecimento de dano oxidativo pode ser potencializado. Essa potencialização pode ocorrer devido às limitações na assimilação do CO₂, que precedem à inativação das reações de transferência de elétrons nos cloroplastos, resultando na produção excessiva de poder redutor e ATP. Parte desse excesso pode ser utilizado na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), potencialmente capazes de resultar em danos fotoinibitórios e fotooxidativos (SMIRNOFF, 1995; ASADA, 1999).

Considerando-se a maior ocorrência de estresse oxidativo em decorrência do *deficit* hídrico, avaliamos a atividade das enzimas SOD, CAT, APX e POX, de forma a verificar se o maior dano no cultivar sensível poderia ser atribuído a contribuição destas enzimas.

Não houve diferenças nas atividades das enzimas SOD, CAT e APX na ausência do *deficit* hídrico entre os cultivares estudados. Sob condições de *deficits* hídricos, moderado e severo, foi observado aumento da atividade de todas as enzimas avaliadas em ambos os cultivares (Figura 9). Foi observado um aumento mais pronunciado na atividade de todas estas enzimas no cultivar sensível ao *deficit* hídrico (BRS 16). Sob estresse hídrico moderado a atividade da enzima SOD aumentou 62%, sob *deficit* severo, 82%, no cultivar sensível BRS 16, e de apenas 26% e 39%, no cultivar tolerante (Figura 9 A). Em ambos os cultivares não houve diferença significativa entre os diferentes níveis de estresse, exceto no que se refere no estresse severo. A atividade da enzima CAT, no cultivar sensível, aumentou drasticamente, 297% e 465%, e no cultivar

tolerante esse aumento foi menor, 177% e 318%, para *deficit* moderado e severo, respectivamente (Figura 9B). A atividade da enzima APX aumentou no cultivar sensível em 117% e 182% e no cultivar tolerante apenas 47% e 90%, sob estresse hídrico moderado e severo respectivamente (Figura 9C). Já para a atividade da enzima POX, houve um aumento de 85% e 137% para o cultivar sensível, e foi menor no cultivar tolerante, 72% e 108%, para *deficits* moderado e severo, respectivamente (Figura 9D). Aparentemente, a maior atividade das enzimas antioxidativas indica uma maior resposta de defesa ligada a um maior estresse oxidativo, do que propriamente um mecanismo de tolerância que contribui para a presença e um estresse oxidativo menor, como observado no cultivar tolerante.

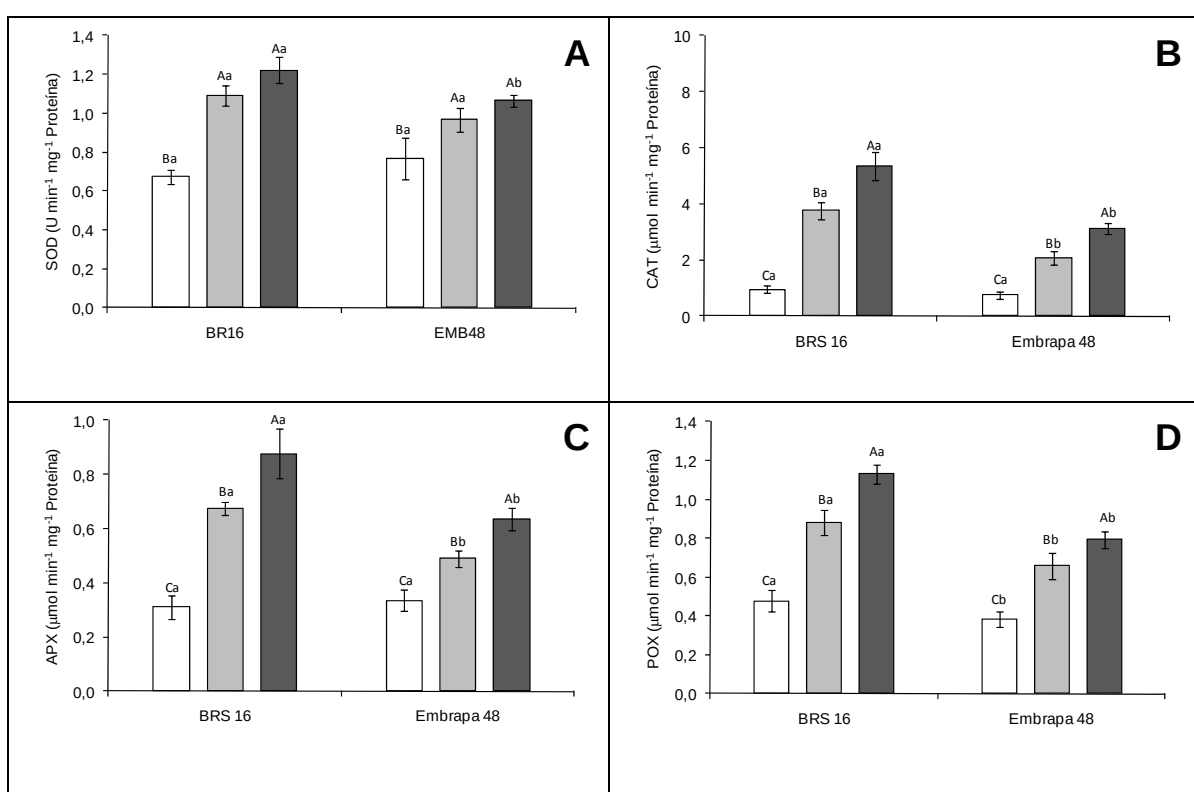


Figura 9. Efeito do *deficit* hídrico na atividade de enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (A), catalase (B), peroxidase do ascorbato (C) e peroxidases totais (D) em cultivares de soja. Detalhes da figura são os mesmos descritos desde a figura 3.

Silva (2007), em estudos em *Coffea canephora* sob *deficit* hídrico, observou um aumento muito mais pronunciado nas atividades de APX e CAT no cultivar sensível (109A), em detrimento do cultivar tolerante (120), sugerindo que os mecanismos antioxidativos teriam uma maior atividade frente à maior geração de espécies reativas

de oxigênio no cultivar sensível, sendo esses resultados compatíveis com o encontrado nesse estudo em soja sob *deficit* hídrico.

A modulação da atividade da SOD é dependente de uma série de fatores, dentre os quais podem ser citados o nível de expressão gênica da enzima, estímulos ambientais, estímulos celulares, possível envolvimento com substâncias sinalizadoras e/ou reguladoras de crescimento e desenvolvimento. Bischof *et al.*, (2003) descreveram diferentes perfis de atividade da SOD em função do tipo de estresse e período de duração, demonstrando o envolvimento e inter-relação de diferentes fatores na regulação desta enzima.

4.4 Teores de pigmentos cloroplastídicos

Os teores de clorofila *a* sempre se mantiveram acima dos níveis de clorofila *b* em todos os tratamentos nos cultivares analisados (Tabela 1). Embora o *deficit* hídrico, em ambos os cultivares tenha reduzido os níveis de clorofila *a*, não houve alteração nos níveis de clorofila *b* e clorofila total. Os teores de carotenóides foram reduzidos na presença de *deficit* hídrico no cultivar sensível, o que não foi observado no cultivar tolerante, o qual, inclusive apresentou níveis superiores de carotenóides sob estresse severo.

Tabela 1. Valores médios e erro padrão do acúmulo de clorofilas (Chl) e carotenóides (Carot) (g m^{-2}), em plantas sensíveis (BRS 16) e tolerantes (Embrapa 48) ao *deficit* hídrico de plantas de soja irrigadas ou sob *deficit* moderado (-1,0 MPa) ou severo (-1,5 MPa).

	BRS 16			Embrapa 48		
	Irigado	-1.0MPa	-1,5MPa	Irigado	-1.0MPa	-1,5MPa
Chl-a	1,46 ^A ±0,04	1,24 ^B ±0,07	1,21 ^{AB} ±0,09	1,46 ^A ±0,06	1,22 ^B ±0,08	1,37 ^{AB} ±0,06
Chl-b	0,60 ^A ±0,03	0,48 ^A ±0,04	0,45 ^A ±0,05	0,54 ^A ±0,04	0,46 ^A ±0,06	0,63 ^A ±0,06
Chl-a+b	2,05 ^A ±0,07	1,72 ^A ±0,11	1,66 ^A ±0,13	1,91 ^A ±0,11	1,68 ^A ±0,13	2,00^A ±0,11
Carot	0,18 ^A ±0,01	0,15 ^A ±0,02	0,14 ^A ±0,02	0,23^A ±0,01	0,20^A ±0,01	0,23^A ±0,02

Diferentes letras, nas linhas, denotam diferença estatística entre os níveis de estresse no mesmo cultivar (teste de Tukey, $p < 0,05$). Valores sublinhados e em negrito indicam diferença estatística entre os cultivares dentro do mesmo tratamento (teste Tukey, $p < 0,05$) ($n=5$).

A maior tolerância ao *deficit* hídrico do cultivar Embrapa 48 pode-se observar de duas formas: a maior lentidão do processo de desidratação, com postergação em 2 dias para alcançar uma redução do potencial hídrico foliar da antemanhã em nível de estresse severo (-1,5 MPa), e nos menores efeitos nas taxas de trocas gasosas e dano oxidativo em folhas. Apesar do cultivar tolerante apresentar, na ausência de estresse hídrico, menor condutância estomática e transpiração, já possuía uma maior fotossíntese e uso da água mais eficiente, necessitando menos água para fixar cada molécula de carbono. Esta comparação permanece válida com o progressivo aumento da desidratação da planta; exceto que sob estresse severo não houve diferença na fotossíntese líquida. Quanto à taxa de transporte de elétrons (*ETR*), observamos que a mesma foi maior no cultivar tolerante na ausência e sob estresse severo, onde o cultivar tolerante apresentou maior *ETR* na ausência e na presença de estresse moderado, mas não sob estresse severo. Sob a progressão do estresse moderado em severo, embora tenha havido redução na condutância, a razão *Ci/Ca* também foi inalterada, como a fotossíntese líquida. Desta forma, pode-se deduzir que o atraso na desidratação do cultivar Embrapa 48 pode ser devido a menor condutância na presença de um estresse hídrico moderado e sua maior eficiência no uso da água, transpirando menos durante os períodos iniciais da deficiência hídrica ou em sua ausência, evitando assim a desidratação mais rápida sob estas condições.

Os dados de fluorescência da clorofila *a* indicam que o estresse não produziu fotoinibição da fase fotoquímica da fotossíntese. A queda na eficiência quântica e quantidade de energia absorvida foi maior no cultivar sensível (BRS 16), o que pode ser explicado pela maior redução nas taxas de fotossíntese líquida observada neste cultivar. A maior redução na taxa de transporte de elétrons no cultivar sensível foi associada ao maior nível de energia luminosa dissipada termicamente (*E*), o que indica que esta maior dissipação seja um possível mecanismo de adaptação ao estresse hídrico ocorrendo em maior nível no cultivar sensível de forma a reduzir o dano oxidativo potencial.

De fato podemos observar maior dano oxidativo no cultivar sensível. Apesar de haver menor transporte de elétrons no cultivar sensível, podemos ver que o nível de peroxidação lipídica é maior neste cultivar tanto na ausência como na presença de diferentes níveis de estresse. Este maior nível de dano oxidativo não pode ser explicado por uma menor atividade das enzimas peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase, visto que as mesmas tiveram atividade maior no cultivar sensível na presença de estresse, e tenham atividades equivalentes na

ausência de estresse. Como a expressão de alguns genes que codificam estas enzimas são induzidos por radicais livres (BISCHOF *et al.*, 2003), como CAT e SOD, é possível que o maior dano oxidativo no cultivar sensível explique a maior atividade destas enzimas na presença do estresse.

O fato de que houve redução na clorofila total no cultivar sensível sob estresse severo e não sob estresse moderado poderia explicar a causa da redução em *ETR* sobre estresse, a qual também não teve redução sob estresse moderado, mas apenas sob o severo. O menor nível de clorofilas associado ao dano oxidativo nos fotossistemas e conseqüente degradação das clorofilas de suas antenas, levaria a redução do fluxo de elétrons na membrana do tilacóide.

4.5 Otimização de um protocolo de extração de proteínas de folhas de soja mais eficiente para análise proteômica

O método de extração otimizado mostrou-se eficaz para obtenção de extratos protéicos compatíveis para análise proteômica pela técnica de eletroforese bidimensional (Figura 10). Entre as principais modificações introduzidas no método proposto por Shen (2002), destacam-se adição de 2-mercaptoetanol, além do DTT, aumento do número de lavagens em acetona do sedimento protéico após precipitação com TCA, lavagem final com etanol 80% e sonicação para melhorar a solubilização das proteínas.

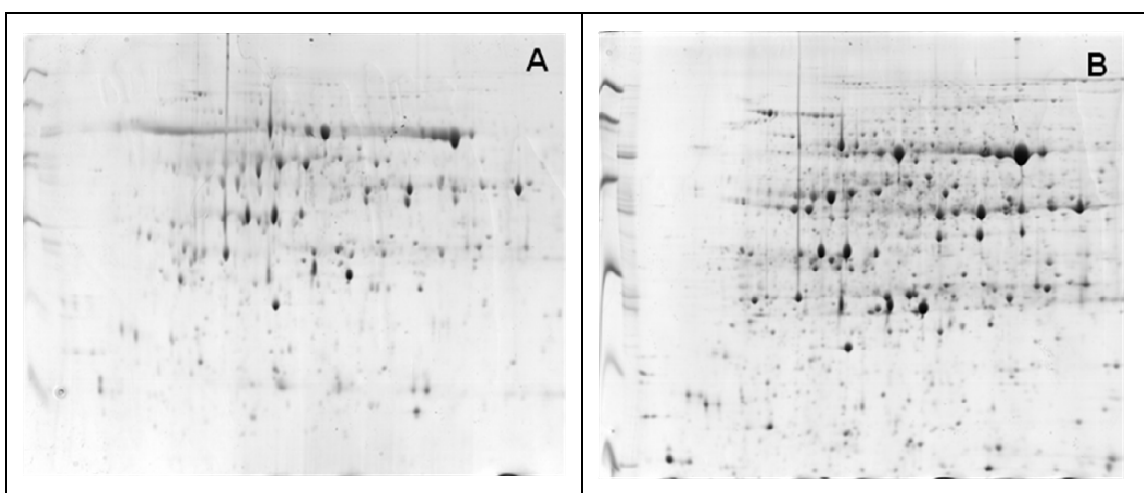


Figura 10. Géis eletroforéticos 2D obtidos após extração de proteínas foliares de soja utilizando o método proposto por Shen (2002). (A) sem modificações e (B) com modificações.

A eficiência da extração de proteínas de folhas de soja com o método proposto foi de cerca de 10 μ g de proteína mg⁻¹ de tecido foliar fresco para os tratamentos irrigados, 12 μ g de proteína mg⁻¹ tecido foliar fresco para os tratamentos de *deficit* moderado (-1,0 MPa) e 9 μ g de proteína mg⁻¹ tecido foliar fresco para os tratamentos de *deficit* severo (-1,5 MPa). Tais valores são superiores a valores encontrados na literatura para outras espécies de plantas: 7 μ g proteína mg⁻¹ de folhas frescas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (SARAVANAN & ROSE, 2004), 9 μ g de proteína mg⁻¹ de folhas frescas de bananeira (*Musa SSP.*) (CARPENTIER *et al.*, 2005). Esses dados confirmam a eficiência do método de extração para folhas de soja (Figuras 10 e 11).

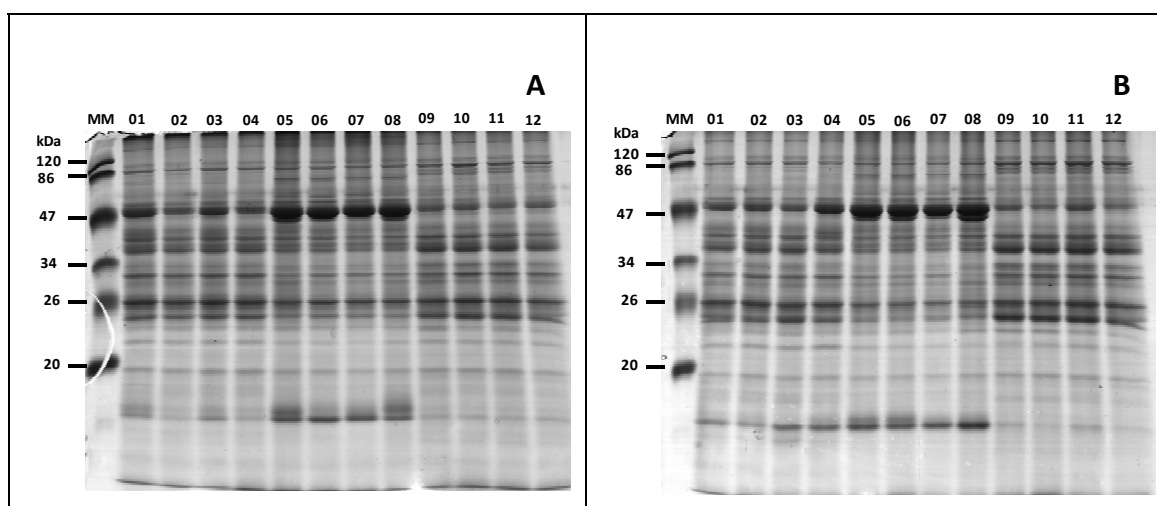


Figura 11. **Avaliação de extração de proteínas de folhas de soja.** Cultivar sensível (A) e tolerante (B) ao *deficit* hídrico. MM – marcador de peso molecular, (1-4) plantas irrigadas, (5-8) plantas sob *deficit* hídrico moderado (-1,0 MPa), (9-12) plantas sob *deficit* hídrico severo (-1,5 MPa). Em cada poço foi aplicado 40 μ g de proteína total em gel SDS-PAGE a 12% que foi corado com *Comassie* coloidal.

4.6 Análise do proteoma diferencial em folhas de soja de cultivares contrastantes ao *deficit* hídrico

A análise do proteoma diferencial foi realizada em folhas de soja de quatro repetições do mesmo material caracterizado fisiologicamente nos tópicos iniciais deste trabalho.

As amostras de proteínas totais extraídas foram separadas na primeira dimensão por ponto isoeletrico em gradiente de pH linear na faixa de 4 a 7, e posteriormente

houve a separação por peso molecular, na segunda dimensão, por eletroforese em condições desnaturantes. As análises nos géis bidimensionais no programa *ImageMaster 2D Platinum* foram realizadas sempre comparando os diferentes cultivares dentro de um mesmo tratamento. Estas análises mostraram grande reprodutibilidade dos resultados, havendo grandes semelhanças entre os géis de um mesmo tratamento em cultivares diferentes (tolerante e sensível). Na Figura 12, os gráficos representam a correspondência de “spots” entre géis de proteínas de folha de soja de tratamentos iguais em cultivares distintos (tolerante e sensível). Nos géis do tratamento irrigado (controle) foram detectados um total de 512 “spots” no cultivar tolerante Embrapa 48 e 501 “spots” no cultivar sensível BRS16, dos quais 314 apresentaram correspondência, ou seja foram identificados em todos os géis comparados (Figura 12A). Dentre os 364 “spots” totais detectados no cultivar tolerante Embrapa 48 e 354 “spots” totais detectados no cultivar sensível BRS 16, 295 apresentaram correspondência entre os géis de proteínas extraídas no tratamento sob *deficit* hídrico moderado (-1,0 MPa) (Figura 12 B). Já no tratamento sob *deficit* severo (-1,5 MPa) foram detectados um total de 456 “spots” no cultivar tolerante Embrapa 48 e 500 “spots” no cultivar sensível BRS 16, onde 345 apresentaram correspondência (Figura 12 C). Neste tipo de gráfico, diferenças de percentagem em volume (abundância relativa) entre géis de amostras obtidas de um mesmo tratamento em cultivares diferentes denotam maiores efeitos dos cultivares quando apresentarem valores de correlação mais distantes da unidade.

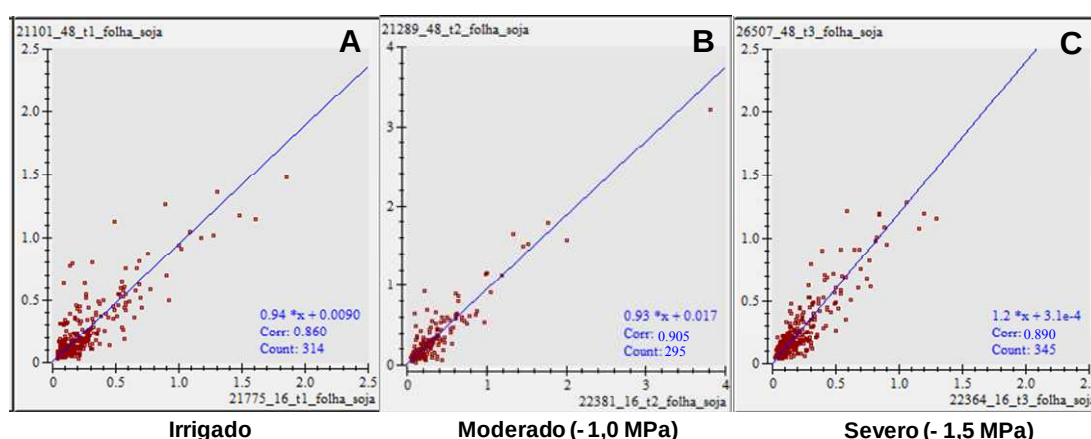


Figura 12. Correlação entre “spots” de géis de proteínas de folhas de soja em cultivares distintos. (A) Tratamento irrigado (controle), correlação entre a percentagem em volume de géis bidimensionais dos cultivares tolerante (Embrapa 48) e sensível (BRS 16) ao *deficit* hídrico. (B) Tratamento de *deficit* hídrico moderado (-1,0 MPa), correlação entre a percentagem em volume de géis bidimensionais dos cultivares tolerante (Embrapa 48) e sensível (BRS 16) ao *deficit* hídrico. (C) Tratamento de *deficit* hídrico severo (-1,5 MPa), correlação entre a percentagem em volume de géis bidimensionais dos cultivares tolerante (Embrapa 48) e sensível (BRS 16) ao *deficit* hídrico. Análise realizada no software *ImageMaster 2D Platinum*. Legenda: *count* refere-se ao numero de “spots” onde existe correspondência. *Corr* refere-se a correlação entre percentagem em volume para o mesmo “spot”

em géis de cultivares distintos. O gráfico tipo *scatter Plot* é caracterizado por uma equação da reta linear $y = ax + b$, onde valores de “a” próximo de um e valores de “b” próximos a zero, mostram menores diferenças entre géis de cultivares diferentes. Maiores efeitos dos cultivares (diferenças de percentagem em volume entre géis de cultivares tolerante e sensível) denotam valores de correlação (*Corr*) mais distantes de uma unidade. Cada ponto no gráfico significa um “spot” onde foi encontrada correspondência entre gel do cultivar tolerante e gel do cultivar sensível. Tratamento irrigado (controle) apresenta 314 “spots” correspondentes, tratamento de *deficit* hídrico moderado (-1,0 MPa) apresenta 295 “spots” correspondentes e tratamento de *deficit* hídrico severo (-1,5 MPa) apresenta 345 “spots” correspondentes.

A comparação dos géis de amostras do tratamento irrigado (controle) apresentou uma correlação de 0,860, no tratamento com *deficit* hídrico moderado (-1,0 MPa) apresentou 0,905 e no tratamento com *deficit* hídrico severo de 0,890. A partir desses valores é possível inferir que existe uma diferença na abundância relativa de proteínas de folhas de soja nos cultivares tolerante Embrapa 48 e sensível BRS 16. Além das análises de correspondência foi realizada análise visual individualizada para confirmar a correspondência de cada “spot” em todos os géis. Para os “spots” onde foi verificada correspondência em pelo menos três géis (réplicas biológicas) procedeu-se a análise de expressão diferencial através da diferença entre a abundância relativa de cada “spot” em diferentes cultivares dentro de um mesmo tratamento. A abundância relativa de cada “spot” dentro de um mesmo tratamento foi determinada através da média da abundância relativa de quatro réplicas biológicas. Os “spots” onde a abundância relativa aumentou ou diminuiu em pelo menos 1,5 vezes e a abundância foi significativamente diferente pelo test t ($p \leq 0,05$) em pelo menos um dos cultivares, foram classificados como diferencialmente expressos e retirados do gel para identificação por espectrometria de massa (MS) em um MALDI TOF TOF. Dentre os “spots” retirados para a identificação, todos apresentaram reprodutibilidade entre as quatro réplicas dentro de cada cultivar, e intensidade suficiente para identificação dos picos de peptídeos por espectrometria de massas. Foram analisados 130 “spots” que apresentaram abundância em percentagem de volume diferencial (Tabelas 2, 3 e 4).

Na Figura 13 estão representados os “spots” que apresentaram abundância diferencial em folhas do tratamento irrigado (controle) e que foram retirados para análise por espectrometria de massa. O número de identificação de cada um dos “spots” indicado no gel bidimensional da Figura 13 permite a verificação da abundância relativa de cada “spot” na Tabela 2. O cultivar tolerante Embrapa 48 em comparação com o cultivar sensível BRS 16 apresentou um total de 52 proteínas diferencialmente expressas, sendo que houve um aumento na abundância relativa em 45 ‘spots’, e uma redução em 03 “spots” e 04 “spots” foram exclusivos desse cultivar no

tratamento irrigado. Desse total de 52 proteínas, 43% foram classificadas em hipotéticas, desconhecidas ou não anotadas, 25% relacionadas a fotossíntese, 20% relacionadas com metabolismo, 6% processamento, 4% transporte de elétrons e 2% sinalização (Figura 14). Sendo que, de maneira geral, houve aumento na expressão nas proteínas do cultivar tolerante em todas as classes funcionais avaliadas, havendo redução em três proteínas classificadas como hipotéticas ou preditas.

A subunidade β da ATP sintase (*'spots'* 79, 1437) foi cerca de 160% mais expresso no cultivar tolerante em relação ao sensível na ausência de estresse (Tabela 2). Já a malato desidrogenase citosólica (*"spots"* 809, 831) apresentou um aumento de cerca de 156% no cultivar tolerante em relação ao sensível na ausência de estresse (Tabela 2). O precursor da glutamina sintetase (*"spot"* 144, 151) foi altamente expresso no cultivar tolerante em relação ao cultivar sensível, apresentando um aumento de cerca de sete vezes (Tabela 2), assim como a subunidade β da glutamina sintetase citosólica (*"spot"* 148) mostrou-se mais expressa no cultivar tolerante em relação ao sensível, sob condição de irrigação plena. A glutamina sintetase (GS) é uma enzima citosólica, participando do principal sistema de incorporação da amônia em compostos orgânicos. A GS hidrolisa ADP e a amônia livre é incorporada no aminoácido glutamato.

A ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco, 560 kDa), é uma enzima cloroplastídica que consiste de oito grandes subunidades (56 kDa) e oito subunidades pequenas (14 kDa). A Rubisco freqüentemente é a proteína mais abundante na Terra, constituindo até metade do total de proteínas do estroma do cloroplasto. Várias isoformas da grande subunidade da Rubisco foram identificadas nesse estudo (*"spots"* 78, 81, 95, 215, 335) e o cultivar tolerante apresentou maior abundância das mesmas em relação ao cultivar sensível, sob condição de irrigação plena, o que corrobora os resultados de fotossíntese líquida (Figura 4 A), em que foi sempre maior no cultivar tolerante. Além disso, o precursor da rubisco ativase (*"spots"* 163, 165) e a rubisco ativase (*"spot"* 161), também foi mais abundante no cultivar tolerante (Tabela 2).

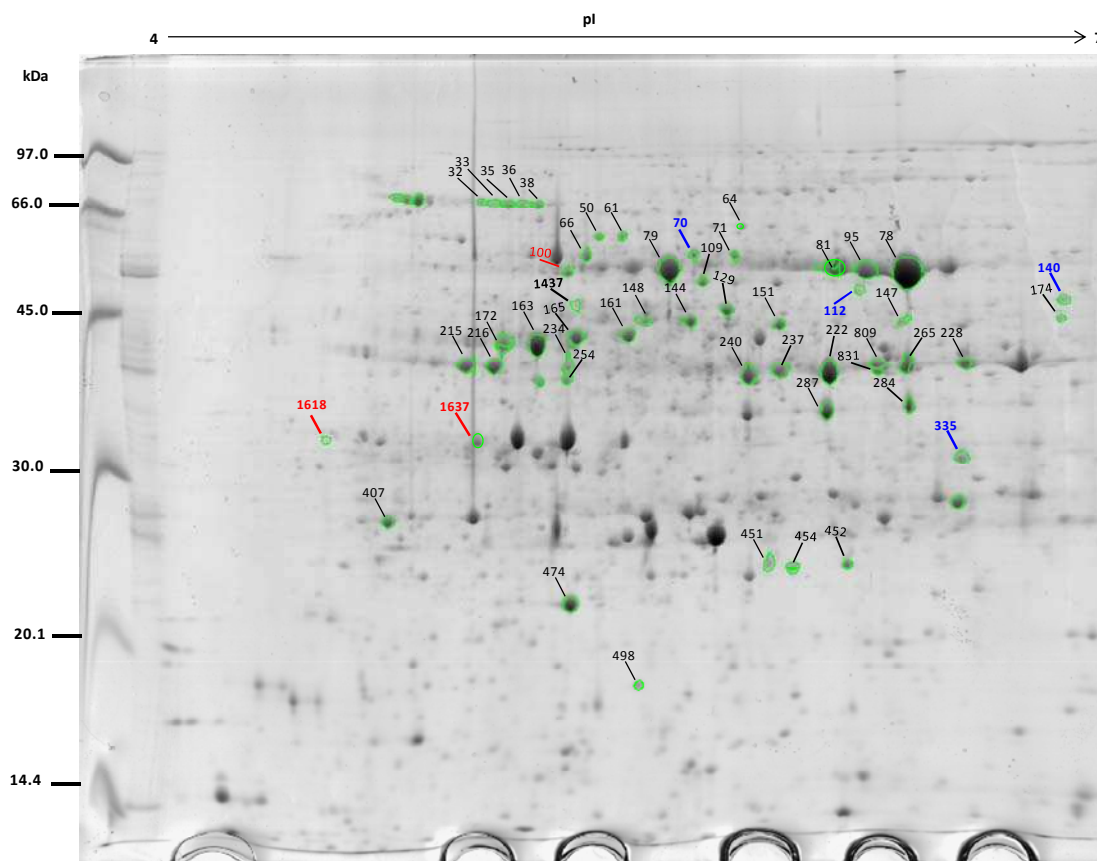


Figura 13. Proteínas de folhas de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao cultivar sensível (BRS 16) sob condições irrigadas (controle). As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com *Coomassie* coloidal. A expressão diferencial foi analisada no *software ImageMaster 2D Platinum*. Legenda: número do “spot” na cor preta significa aumento na expressão no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao sensível (BRS 16), número do “spot” na cor vermelha significa redução na expressão no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao sensível (BRS 16) e número do “spot” na cor azul significa que aquele “spot” foi detectado apenas no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao sensível (BRS 16).

Tabela 2. Média da abundancia relativa (% volume) das proteínas diferencialmente expressas (P<0,05), em cultivares contrastantes de soja em regime irrigado (ausência de *deficit*), com sua identificação putativa das proteínas por MS.

Spot ID		Identificação putativa	CLONES		(%)
			Tolerante	Sensível	
Fotossíntese					
335	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Hypserpa nitida]	0,847 ± 0,058	0,000 ± 0,000	Presente	
140	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Prunus armeniaca var. ansu]	0,086 ± 0,008	0,000 ± 0,000	Presente	
474	PSII Oxygen-evolving enhancer protein 2 precursor	1,208 ± 0,258	0,160 ± 0,044	653,39	
163	Rubisco activase, chloroplast precursor [Vigna radiata]	2,826 ± 0,430	0,843 ± 0,268	235,09	
78	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Falkia repens]	8,422 ± 0,853	2,622 ± 0,101	221,24	
165	Rubisco activase, chloroplast precursor [Vigna radiata]	0,838 ± 0,099	0,311 ± 0,027	169,41	
161	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase alpha 2 [Gossypium hirsutum]	0,614 ± 0,016	0,232 ± 0,024	164,96	
95	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Chrysophyllum oliviforme]	2,493 ± 0,264	0,980 ± 0,248	154,49	
81	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Falkia repens]	1,531 ± 0,208	0,608 ± 0,064	151,71	
215	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Chionochloa acicularis]	1,088 ± 0,265	0,433 ± 0,061	151,13	
Hipotéticas, desconhecidas ou não notadas					
70	Hypothetical protein [Vitis vinifera]	0,130 ± 0,046	0,000 ± 0,000	Presente	
112	Hypothetical protein SORBIDRAFT_01g013800 [Sorghum bicolor]	0,082 ± 0,010	0,000 ± 0,000	Presente	
129	Hypothetical protein isoform 2 [Vitis vinifera]	0,713 ± 0,260	0,106 ± 0,038	573,73	
147	Os07g0622700 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	0,084 ± 0,017	0,024 ± 0,006	246,23	
38	Unknown [Zea mays]	0,194 ± 0,066	0,056 ± 0,021	245,83	
36	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,207 ± 0,004	0,062 ± 0,022	236,69	
64	Predicted protein [Micromonas pusilla CCMP1545]	0,116 ± 0,007	0,035 ± 0,002	232,98	
61	Unnamed protein product [Vitis vinifera]	0,118 ± 0,009	0,037 ± 0,007	218,21	
452	Hypothetical protein Osl_38632 [Oryza sativa Indica Group]	0,292 ± 0,104	0,102 ± 0,025	186,92	
228	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,773 ± 0,044	0,290 ± 0,044	166,53	
498	Unknown [Picea sitchensis]	0,133 ± 0,031	0,050 ± 0,007	166,52	
71	Hypothetical protein SORBIDRAFT_09g004780 [Sorghum bicolor]	0,224 ± 0,044	0,085 ± 0,013	164,30	
451	Predicted protein [Populus trichocarpa]	0,332 ± 0,066	0,126 ± 0,022	163,49	
407	Hypothetical protein SORBIDRAFT_05g010323 [Sorghum bicolor]	0,599 ± 0,029	0,232 ± 0,010	158,35	
240	Hypothetical protein Osl_12352 [Oryza sativa Indica Group]	2,525 ± 0,211	0,980 ± 0,087	157,60	
234	Predicted protein [Populus trichocarpa]	0,304 ± 0,044	0,118 ± 0,026	157,24	
454	Os02g0762300 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	0,121 ± 0,028	0,048 ± 0,006	154,11	
254	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,204 ± 0,040	0,080 ± 0,022	153,55	
216	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,990 ± 0,082	0,394 ± 0,027	151,50	
1637	Hypothetical protein Osl_18273 [Oryza sativa Indica Group]	0,040 ± 0,006	0,144 ± 0,029	72,09	
100	Hypothetical protein [Vitis vinifera]	0,144 ± 0,035	0,363 ± 0,059	60,21	
1618	Predicted protein [Ostreococcus lucimarinus CCE9901]	0,057 ± 0,020	0,144 ± 0,029	60,02	
Metabolismo					
144	Glutamine synthetase precursor [Glycine max]	0,515 ± 0,093	0,058 ± 0,023	792,37	
151	Glutamine synthetase precursor [Glycine max]	0,389 ± 0,083	0,050 ± 0,045	670,14	
148	Cytosolic glutamine synthetase GSbeta1 [Glycine max]	0,211 ± 0,027	0,048 ± 0,022	341,25	
265	Lactuca sativa aldehyde oxidase I	0,898 ± 0,047	0,282 ± 0,038	217,81	
79	ATP synthase CF1 beta subunit [Caulerpa taxifolia]	3,113 ± 0,099	1,150 ± 0,274	170,74	
50	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein [Zea mays]	0,160 ± 0,036	0,061 ± 0,015	161,42	
831	Cytosolic malate dehydrogenase [Glycine max]	0,256 ± 0,031	0,100 ± 0,035	156,87	
172	Phosphoribulose kinase, putative [Ricinus communis]	0,809 ± 0,132	0,316 ± 0,041	156,32	
809	Cytosolic malate dehydrogenase [Glycine max]	0,435 ± 0,006	0,170 ± 0,035	155,79	
1437	ATP synthase beta subunit [Nepenthes alata]	0,254 ± 0,048	0,099 ± 0,018	155,74	
109	Alanine aminotransferase 2 [Glycine max]	0,330 ± 0,010	0,130 ± 0,020	153,39	
66	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	0,358 ± 0,031	0,142 ± 0,064	152,36	
222	Ribosomal protein subunit 2 [Pheipanche arenaria]	2,868 ± 0,159	1,144 ± 0,066	150,75	
Processamento					
32	Endoplasmic reticulum HSC70-cognate binding protein precursor [Glycine max]	0,284 ± 0,023	0,077 ± 0,018	269,57	
237	Chloroplast translational elongation factor Tu [Oryza sativa]	0,581 ± 0,060	0,182 ± 0,023	219,12	
35	Endoplasmic reticulum HSC70-cognate binding protein precursor [Glycine max]	0,236 ± 0,010	0,078 ± 0,012	203,90	
Sinalização					
33	Calmodulin-2 [Glycine max]	0,237 ± 0,061	0,077 ± 0,008	206,10	
174	Leucine-rich repeat receptor-like kinase Atlg09970 [Arabidopsis thaliana]	0,070 ± 0,010	0,027 ± 0,003	160,26	
Transporte de elétrons					
287	Ferredoxin--NADP reductase, chloroplastic; Short=FNR; Flags: Precursor [Vicia faba]	2,462 ± 0,094	0,976 ± 0,046	152,31	
284	Chain A, Wild Type, Ben Fer	0,783 ± 0,095	0,312 ± 0,060	151,12	

Os valores representam as médias da percentagem em volume (abundancia relativa) $\pm$ o desvio padrão de quatro réplicas biológicas. As barras azuis representam em percentagem o quanto a abundancia protéica aumentou no cultivar tolerante em relação ao sensível. As barras vermelhas significam o quanto a abundancia protéica diminuiu no cultivar tolerante em relação ao sensível. As médias diferem entre si segundo teste T student ($p<0.05$).

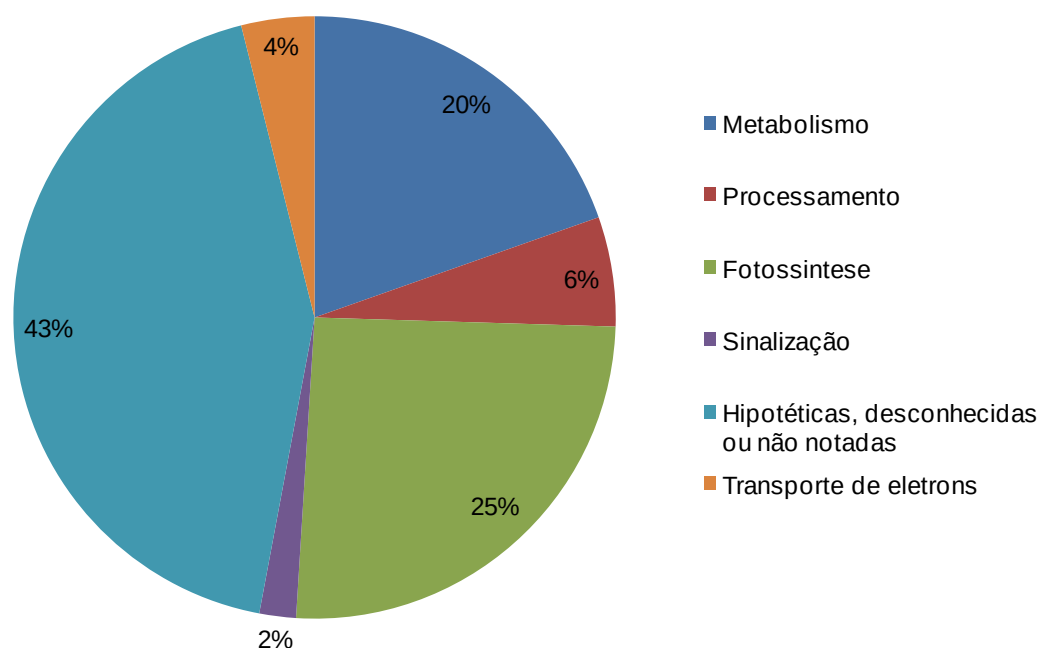


Figura 14. Classificação funcional de proteínas de folhas de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao cultivar sensível (BRS 16) sob condições irrigadas (controle).

Na Figura 15 estão representados os “spots” que apresentaram abundância diferencial em folhas do tratamento de *deficit* hídrico moderado (-1,0 MPa) e que foram retirados para identificação por espectrometria de massa. O número de identificação de cada um dos “spots” indicado no gel bidimensional da Figura 15 permite a verificação da abundância relativa de cada “spot” na Tabela 3. O cultivar tolerante Embrapa 48 em comparação com o sensível BRS 16 apresentou 32 proteínas diferencialmente expressas, em que houve um aumento na abundância relativa em 23 “spots”, uma redução em 05 “spots”, 03 “spots” foram exclusivos desse cultivar e 01 “spot” foi exclusivo do cultivar sensível BRS 16 sob *deficit* moderado. Dessas 32 proteínas, 44% foram classificadas em hipotéticas, desconhecidas ou não anotadas, 22% proteínas relacionadas ao metabolismo, 16% relacionadas a fotossíntese, 6% processamento protéico, 6% sinalização e 6% ao estresse oxidativo (Figura 16). Sendo que, de maneira geral, houve aumento na expressão nas proteínas do cultivar tolerante em todas as classes funcionais avaliadas, havendo redução em duas proteínas fotossintéticas

(Rubisco), uma proteína do metabolismo (malato desidrogenase), uma de sinalização e uma classificada como hipotética.

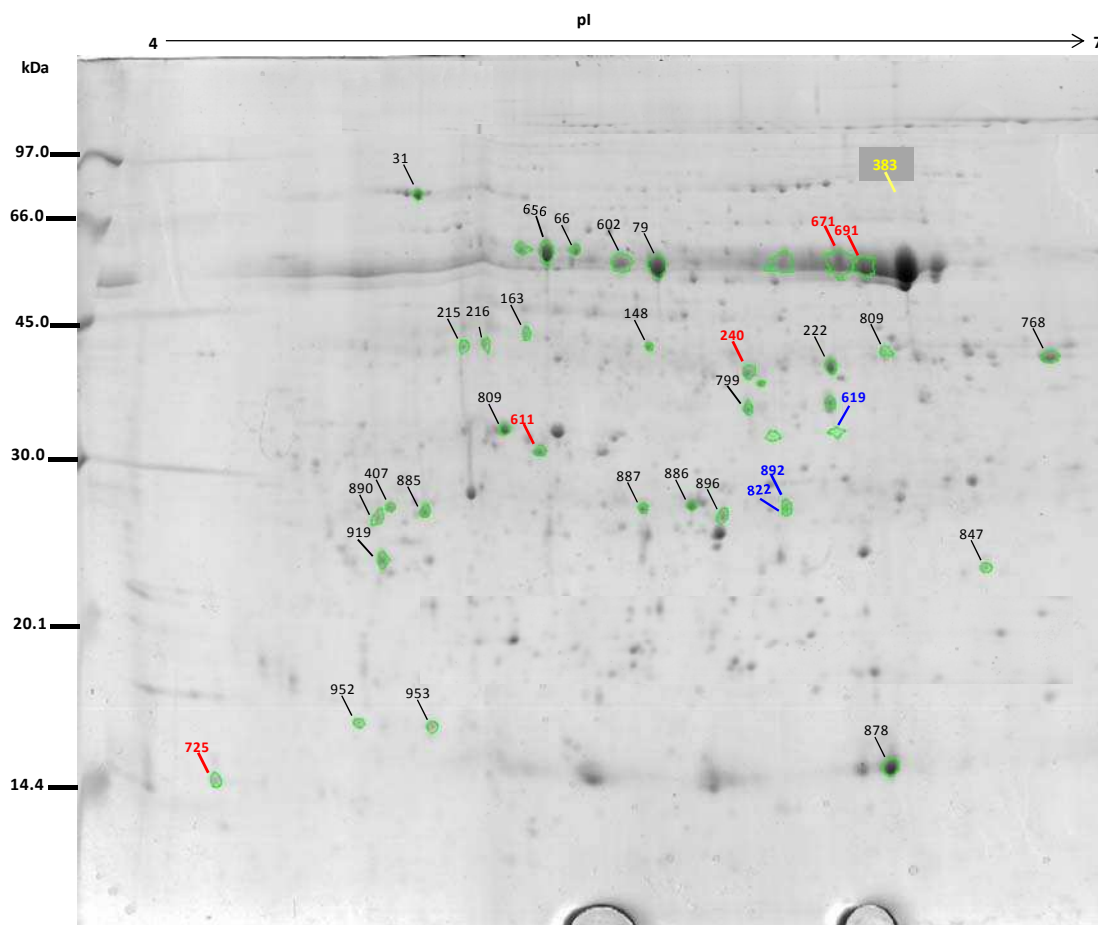


Figura 15. Proteínas de folhas de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao cultivar sensível (BRS 16) sob condições de déficit moderado (-1,0 MPa). As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com *Coomassie* coloidal. A expressão diferencial foi analisada no *software ImageMaster 2D Platinum*. Legenda: número do “spot” na cor preta significa aumento na expressão no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao sensível (BRS 16), número do “spot” na cor vermelha significa redução na expressão no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao sensível (BRS 16), número do “spot” na cor azul significa que aquele “spot” foi detectado apenas no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao sensível (BRS 16) e número do “spot” na cor amarela significa que aquele “spot” foi detectado apenas no cultivar sensível (BRS 16) em relação ao tolerante (Embrapa 48).

Tabela 3. Média da abundancia relativa (% volume) das proteínas diferencialmente expressas em cultivares contrastantes de soja sob *deficit* hídrico moderado (-1,0 MPa), com sua respectiva identificação putativa das proteínas por MS.

Spot ID	Identificação putativa	CLONES		
		Tolerante	Sensível	(%)
Estresse oxidativo				
822	Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic; Flags: Precursor [Glycine max]	0,162 ± 0,043	0,000 ± 0,000	Presente
886	Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic; Flags: Precursor [Glycine max]	0,509 ± 0,032	0,178 ± 0,022	186,13
Fotossíntese				
215	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Chionochloa acicularis]	0,301 ± 0,064	0,109 ± 0,048	176,09
163	Rubisco activase, chloroplast precursor [Vigna radiata]	0,270 ± 0,092	0,102 ± 0,009	164,49
878	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit rbcS1 [Glycine max]	2,516 ± 0,039	0,995 ± 0,274	152,78
95	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Chrysophyllum oliviforme]	2,658 ± 0,279	8,544 ± 0,761	68,89
81	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Falkia repens]	1,854 ± 0,233	4,661 ± 0,139	60,23
Hipotéticas, desconhecidas ou não notadas				
823	Hypothetical protein [Vitis vinifera]	0,031 ± 0,005	0,000 ± 0,000	Presente
885	Hypothetical protein SORBIDRAFT_05g010323 [Sorghum bicolor]	0,287 ± 0,078	0,082 ± 0,028	252,11
799	Hypothetical protein [Vitis vinifera]	0,381 ± 0,083	0,130 ± 0,007	193,64
952	Unknown [Zea mays]	0,143 ± 0,015	0,052 ± 0,006	175,05
953	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,213 ± 0,002	0,079 ± 0,009	169,31
890	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,219 ± 0,026	0,082 ± 0,009	168,06
919	Predicted protein [Micromonas sp. RCC299]	0,362 ± 0,083	0,135 ± 0,028	167,80
240	Hypothetical protein OsI_12352 [Oryza sativa Indica Group]	0,673 ± 0,097	0,258 ± 0,025	161,24
896	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,314 ± 0,042	0,120 ± 0,015	161,09
407	Hypothetical protein SORBIDRAFT_05g010323 [Sorghum bicolor]	0,219 ± 0,013	0,084 ± 0,009	160,51
887	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,351 ± 0,059	0,140 ± 0,033	151,51
768	Predicted protein [Populus trichocarpa]	1,225 ± 0,129	0,489 ± 0,047	150,55
216	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,326 ± 0,095	0,132 ± 0,039	147,25
725	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,178 ± 0,030	0,456 ± 0,075	60,88
Metabolismo				
148	Cytosolic glutamine synthetase GSbeta1 [Glycine max]	0,270 ± 0,092	0,088 ± 0,023	205,85
602	ATP synthase beta subunit [Utricularia biflora]	0,994 ± 0,148	0,383 ± 0,196	159,36
66	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	0,502 ± 0,058	0,195 ± 0,026	156,98
79	ATP synthase CF1 beta subunit [Caulerpa taxifolia]	3,544 ± 0,388	1,391 ± 0,070	154,83
222	Ribosomal protein subunit 2 [Phelipanche arenaria]	0,842 ± 0,168	0,334 ± 0,058	152,09
656	ATP synthase CF1 alpha subunit [Glycine max]	2,604 ± 0,111	1,040 ± 0,038	150,38
809	Cytosolic malate dehydrogenase [Glycine max]	0,066 ± 0,012	0,168 ± 0,060	60,59
Processamento				
31	Heat shock protein, putative [Ricinus communis]	0,847 ± 0,058	0,335 ± 0,040	152,77
383	Elongation factor 2 (EF-2) [Beta vulgaris]	0,000 ± 0,000	0,112 ± 0,032	Ausente
Sinalização				
892	Annexin, putative [Ricinus communis]	0,150 ± 0,028	0,000 ± 0,000	Presente
611	AT5G50010 [Arabidopsis thaliana]	0,288 ± 0,122	0,796 ± 0,044	63,80

Os valores representam as médias da percentagem em volume (abundancia relativa) ± o desvio padrão de quatro réplicas biológicas. As barras azuis representam em porcentagem o quanto a abundancia protéica aumentou no cultivar tolerante em relação ao cultivar sensível. As barras vermelhas significam o quanto a abundancia protéica diminuiu no cultivar tolerante em relação ao sensível. As médias diferem entre si segundo teste T student ($p \leq 0,05$).

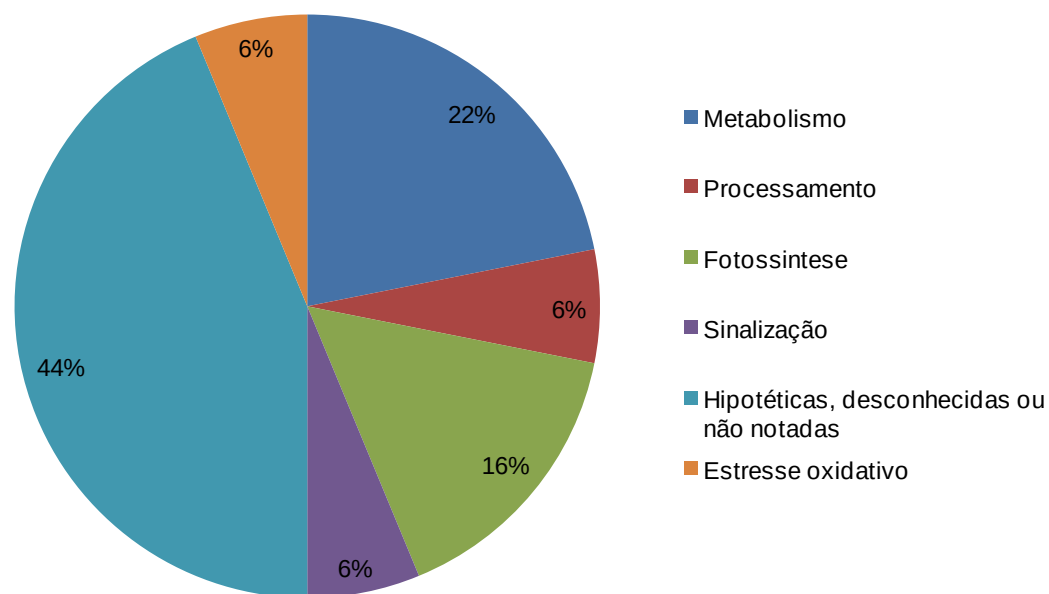


Figura 16. Classificação funcional de proteínas de folhas de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao cultivar sensível (BRS 16) sob condições de *deficit* moderado (-1,0 MPa).

Na Figura 17, estão representados os “spots” que apresentaram abundância diferencial em folhas do tratamento de *deficit* hídrico severo (-1,5 MPa) e que foram retirados para identificação por espectrometria de massa. Os números de identificação de cada um dos “spots” indicados no gel bidimensional da Figura 17 permitem a verificação da abundância relativa de cada ‘spot’ na Tabela 4. O cultivar tolerante Embrapa 48 em comparação com o sensível BRS 16 apresentou 46 proteínas com expressão diferencial entre os cultivares, onde ocorreu um aumento na abundância relativa em 39 “spots”, uma redução em 07 “spots” e 01 ‘spot’ foi exclusivo desse cultivar no tratamento sob *deficit* severo. Desse total de proteínas diferencialmente expressas, 42% foram classificadas em hipotéticas, desconhecidas, ou não anotadas, 22% proteínas relacionadas ao metabolismo, 13% relacionadas a fotossíntese, 9% ao estresse oxidativo, 7% ao transporte de elétrons, 5% sinalização e 2% ao processamento protéico (Figura 18). Sendo que, de maneira geral, houve aumento na expressão nas proteínas do cultivar tolerante em todas as classes funcionais avaliadas, havendo

redução em três proteínas do metabolismo antioxidativo (Fe-SOD), duas do metabolismo (ATP sintase) uma classificada como não anotada.

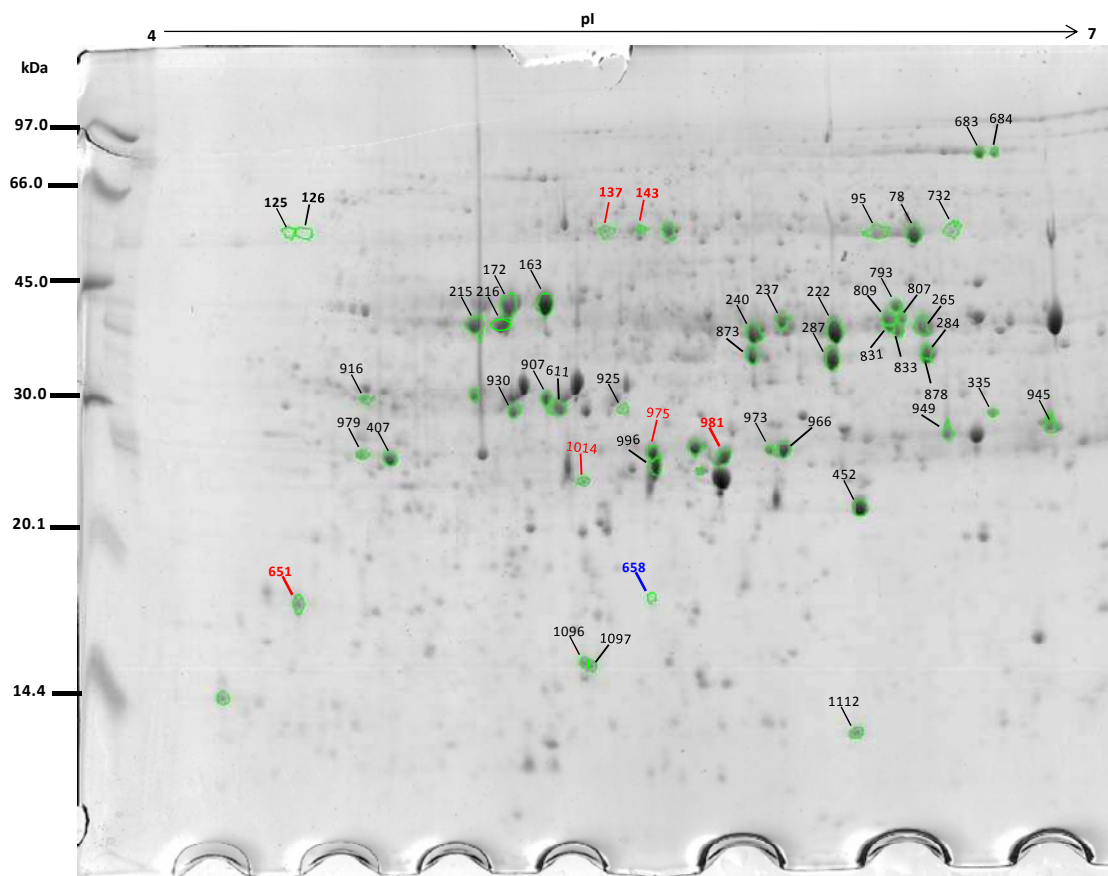


Figura 17. Proteínas de folhas de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao cultivar sensível (BRS 16) sob condições de deficit severo (-1,5 MPa). As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com *Coomassie* coloidal. A expressão diferencial foi analisada no *software ImageMaster 2D Platinum*. Legenda: número do “spot” na cor preta significa aumento na expressão no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao sensível (BRS 16), número do “spot” na cor vermelha significa redução na expressão no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao sensível (BRS 16) e número do “spot” na cor azul significa que aquele “spot” foi detectado apenas no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao sensível (BRS 16).

Tabela 4. Média da abundancia relativa (% volume) das proteínas diferencialmente expressas em cultivares contrastantes de soja sob *deficit* hídrico severo (-1,5 MPa), com sua identificação putativa das proteínas por MS.

Spot ID		Identificação putativa	CLONES		
			Tolerante	Sensível	(%)
Estresse oxidativo					
973	Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic; Flags: Precursor [Glycine max]	0,197 ± 0,076	0,075 ± 0,095	161,75	
1014	Iron-superoxide dismutase [Glycine max]	0,030 ± 0,010	0,111 ± 0,050	72,87	
975	Iron-superoxide dismutase [Glycine max]	0,044 ± 0,009	0,147 ± 0,028	69,81	
981	Iron-superoxide dismutase [Glycine max]	0,056 ± 0,028	0,186 ± 0,046	69,74	
Fotossíntese					
78	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Falkia repens]	1,912 ± 0,103	0,473 ± 0,021	304,54	
163	Rubisco activase, chloroplast precursor [Vigna radiata]	3,173 ± 0,053	0,808 ± 0,065	292,42	
732	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Croton yucatanensis]	0,184 ± 0,001	0,057 ± 0,008	220,22	
215	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Chionochloa acicularis]	1,568 ± 0,158	0,539 ± 0,093	190,75	
95	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Chrysophyllum oliviforme]	0,557 ± 0,095	0,196 ± 0,017	183,62	
335	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Hypserpa nitida]	0,208 ± 0,017	0,080 ± 0,005	160,68	
Hipotéticas, desconhecidas ou não notadas					
658	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	1,065 ± 0,288	0,000 ± 0,000	Presente	
407	Hypothetical protein SORBIDRAFT_05g010323 [Sorghum bicolor]	0,835 ± 0,019	0,164 ± 0,041	410,42	
966	Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g010090 [Sorghum bicolor]	1,309 ± 0,216	0,330 ± 0,021	296,01	
949	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,785 ± 0,037	0,228 ± 0,068	244,67	
684	Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g004825 [Sorghum bicolor]	0,361 ± 0,069	0,120 ± 0,033	199,73	
873	Unnamed protein product [Vitis vinifera]	0,986 ± 0,081	0,341 ± 0,012	189,22	
916	Unknown [Zea mays]	0,138 ± 0,034	0,049 ± 0,012	180,07	
216	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	1,772 ± 0,108	0,651 ± 0,062	172,38	
930	Os04g0490800 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	0,588 ± 0,039	0,218 ± 0,092	169,75	
611	AT5G50010 [Arabidopsis thaliana]	0,736 ± 0,055	0,275 ± 0,004	167,90	
125	unknown [Zea mays]	0,166 ± 0,012	0,064 ± 0,007	161,11	
1097	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,340 ± 0,013	0,131 ± 0,020	159,81	
240	Hypothetical protein OsI_12352 [Oryza sativa Indica Group]	2,112 ± 0,132	0,824 ± 0,062	156,34	
945	Hypothetical protein OsJ_14092 [Oryza sativa Japonica Group]	0,447 ± 0,018	0,176 ± 0,021	154,50	
807	unknown [Picea sitchensis]	0,360 ± 0,060	0,142 ± 0,007	152,55	
833	Hypothetical protein SORBIDRAFT_02g031280 [Sorghum bicolor]	0,506 ± 0,065	0,201 ± 0,041	152,23	
126	Predicted protein [Populus trichocarpa]	1,334 ± 0,112	0,529 ± 0,084	152,22	
452	Hypothetical protein OsI_38632 [Oryza sativa Indica Group]	1,666 ± 0,172	0,664 ± 0,192	151,08	
651	Unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]	0,139 ± 0,059	0,352 ± 0,007	60,53	
Metabolismo					
979	Maturase K [Boerhavia coccinea]	0,191 ± 0,015	0,043 ± 0,001	348,04	
683	Methionine synthase [Glycine max]	0,439 ± 0,087	0,120 ± 0,033	265,08	
222	Ribosomal protein subunit 2 [Phelipanche arenaria]	3,294 ± 0,217	1,241 ± 0,416	165,50	
1096	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein [Zea mays]	0,356 ± 0,022	0,136 ± 0,022	162,87	
831	Cytosolic malate dehydrogenase [Glycine max]	0,361 ± 0,111	0,138 ± 0,026	161,44	
809	Cytosolic malate dehydrogenase [Glycine max]	0,534 ± 0,184	0,206 ± 0,043	158,73	
925	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein [Zea mays]	0,093 ± 0,007	0,037 ± 0,053	151,55	
265	Lactuca sativa aldehyde oxidase 1	0,903 ± 0,049	0,361 ± 0,033	150,37	
143	ATP synthase, beta subunit [Iphegenia indica]	0,114 ± 0,009	0,609 ± 0,153	81,26	
137	ATP synthase beta subunit [Schoepfia schreberi]	0,153 ± 0,045	0,387 ± 0,081	60,49	
Processamento					
237	Chloroplast translational elongation factor Tu [Oryza sativa]	0,637 ± 0,085	0,248 ± 0,038	157,12	
Sinalização					
907	R2R3-MYB transcription factor [Arabidopsis thaliana]	0,705 ± 0,034	0,257 ± 0,153	174,30	
172	Phosphoribulose kinase, putative [Ricinus communis]	1,731 ± 0,248	0,632 ± 0,157	173,97	
1112	Nucleoside diphosphate kinase [Glycine max]	0,238 ± 0,048	0,089 ± 0,020	166,85	
Transporte de elétrons					
284	Chain A, Wild-Type Pea Fnr	0,791 ± 0,072	0,255 ± 0,012	209,75	
878	Chain A, Wild-Type Pea Fnr	0,373 ± 0,032	0,130 ± 0,030	186,55	
287	Ferredoxin--NADP reductase, chloroplastic; Short=FNR; Flags: Precursor [Vicia faba]	2,995 ± 0,097	1,175 ± 0,144	154,87	

Os valores representam as médias da percentagem em volume (abundancia relativa) ± o desvio padrão de quatro réplicas biológicas. As barras azuis representam em porcentagem o quanto a abundancia protéica aumentou no cultivar tolerante em relação ao sensível. As barras vermelhas significam o quanto a abundancia protéica diminuiu no cultivar tolerante em relação ao sensível. As médias diferem entre si segundo teste T student ($p \leq 0,05$).

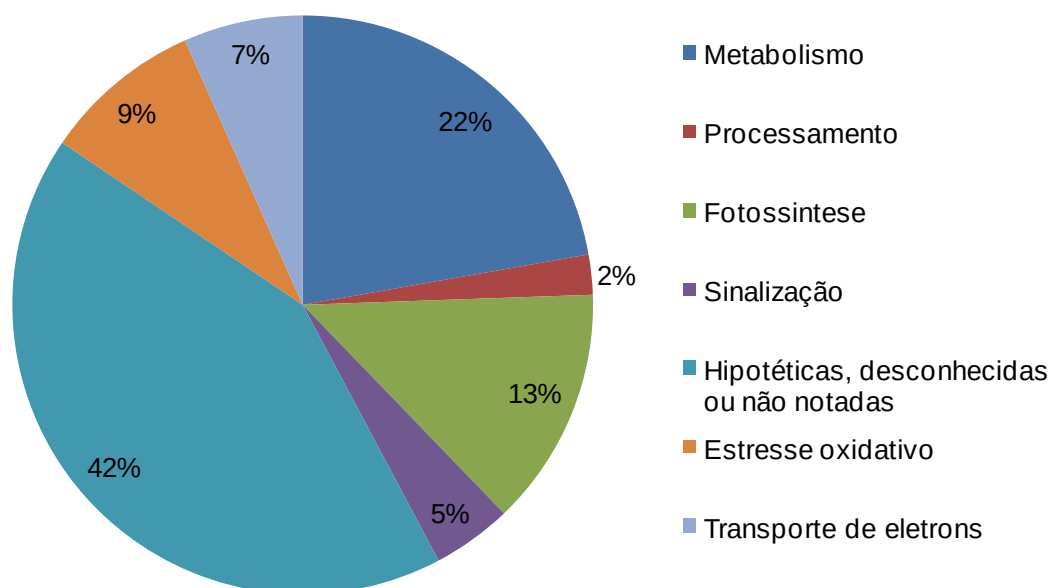


Figura 18. Classificação funcional de proteínas de folhas de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao cultivar sensível (BRS 16) sob condições de *deficit* severo (-1,5 MPa).

Os dados da análise proteômica diferencial dos cultivares contrastantes revelam que existe uma modulação na expressão de proteínas com destaque para proteínas do metabolismo, como as de síntese de aminoácidos e fotossintéticas, as quais mostraram-se mais abundantes no cultivar tolerante tanto na condição irrigada como sob *deficits*, sendo que sob estresse severo houve uma redução na expressão de proteínas Fe-SOD relacionadas ao estresse oxidativo, o que confirma os dados de maior atividade enzimática desta enzima no cultivar sensível, nestas condições (Figura 9A).

4.7 Análise do proteoma diferencial de proteínas responsivas ao *deficit* hídrico no cultivar tolerante (Embrapa 48)

As análises realizadas para o proteoma diferencial de proteínas responsivas ao *deficit* hídrico no cultivar tolerante seguiram o mesmo padrão do item anterior, porém as

comparações foram feitas para cada nível de *deficit* hídrico (-1,0 e -1,5 MPa) em comparação com o controle (irrigado).

As proteínas de folhas do cultivar tolerante (Embrapa 48) ao *deficit* hídrico mostraram diferenças na expressão de proteínas quando submetido ao *deficit* hídrico. As imagens dos géis foram comparadas quanto à porcentagem de volume (% Vol) dos “spots” nas plantas submetidas ao *deficit* hídrico em relação ao controle (irrigado). Essas proteínas diferencialmente expressas são ditas responsivas ao *deficit* hídrico, devido apresentarem aumento ou diminuição na expressão em termos de abundância relativa. Os géis contendo as proteínas extraídas de folhas do cultivar Embrapa 48 submetido ao *deficit* hídrico moderado (-1,0 MPa) apresentaram 39 proteínas com abundância diferencial em relação ao controle (Figura 19). Dessas, 34 foram reduzidas, 4 foram aumentadas e 01 não foi expressa com a imposição do *deficit* moderado (Tabela 5) e do total de proteínas diferencialmente expressas 32% foram classificadas em hipotéticas, desconhecidas ou não anotadas, 30% relacionadas ao metabolismo, 24% a fotossíntese, 8% ao processamento protéico, 3% a sinalização e 3% ao estresse oxidativo (Figura 20).

A subunidade β da ATP sintase (“spot” 79) mostrou-se responsiva ao *deficit* hídrico moderado, apresentando uma redução de 61% em relação ao controle (Tabela 5). A malato desidrogenase (“spot” 809) também se mostrou responsiva ao *deficit* hídrico no cultivar tolerante apresentando uma redução de cerca de 64% sob *deficit* moderado (tabela 5). O precursor da glutamina sintetase citosólica (“spots” 141 e 154) sofreu redução na sua expressão quando submetida ao *deficit* moderado (Tabela 5). A Rubisco também se mostrou responsiva ao *deficit* hídrico no cultivar tolerante, uma vez que, a pequena subunidade aumentou (“spots” 878, 854, 877) e a grande subunidade (“spot” 215) reduziu sob *deficit* moderado (Tabela 5). Já sob *deficit* severo houve redução na abundância relativa das grandes subunidades da Rubisco (“spots” 78, 81, 95). Sob *deficit* moderado uma HSP (“spot” 31) apresentou maior abundância relativa no cultivar tolerante em comparação com o cultivar sensível (Tabela 3). O cultivar tolerante também apresentou uma outra HSP responsiva ao *deficit* hídrico severo (“spot” 30), em que a mesma foi reduzida sob *deficit* severo. Adicionalmente outra HSP (“spot” 31) foi detectada apenas no tratamento irrigado (Tabela 6).

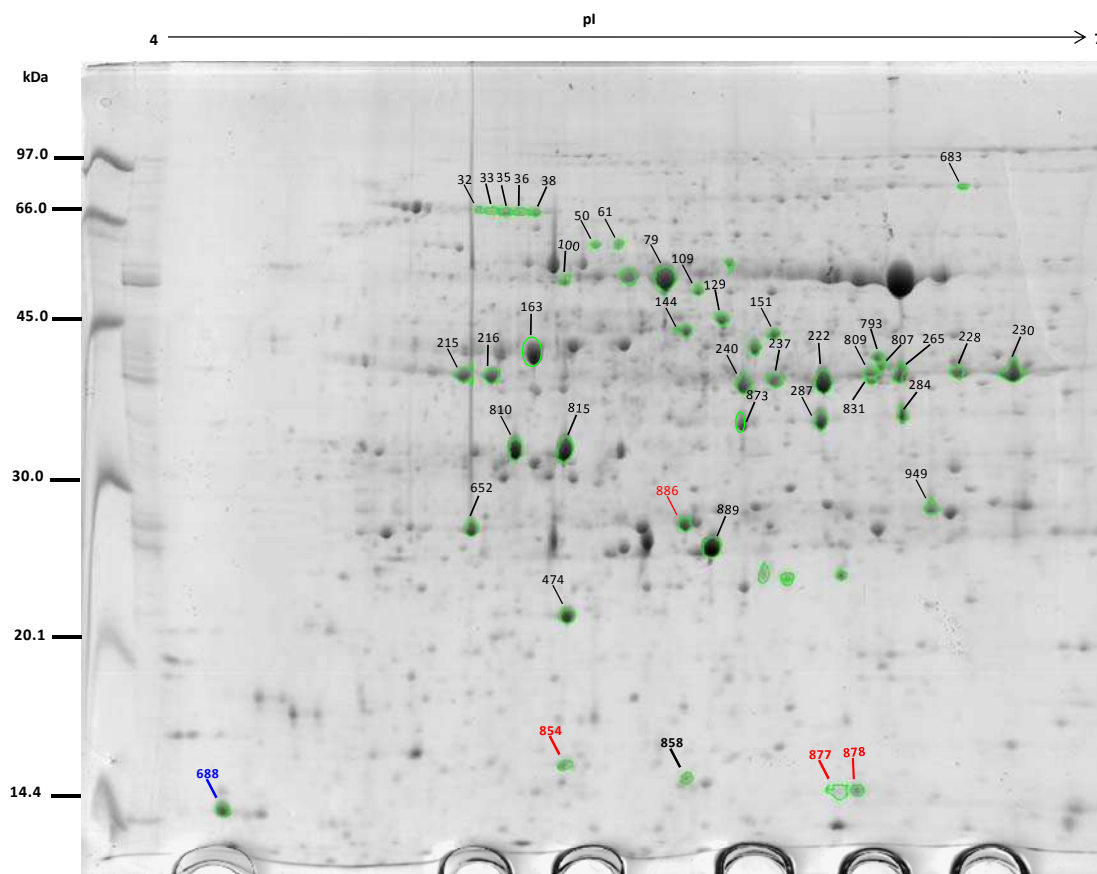


Figura 19. **Proteínas de folhas de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) quando submetido ao deficit moderado (-1,0 MPa).** As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com *Coomassie* coloidal. A expressão diferencial foi analisada no *software ImageMaster 2D Platinum*. Legenda: número do “spot” na cor preta significa redução na expressão em relação ao controle (irrigado), número do “spot” na cor vermelha significa aumento na expressão em relação ao controle (irrigado) e número do “spot” na cor azul significa que aquele “spot” foi detectado apenas no tratamento controle (irrigado) em relação ao gel do tratamento sob deficit moderado (-1,0 MPa).

Tabela 5. Média da abundancia relativa (% volume) das proteínas responsivas ao *deficit* hídrico moderado (-1,0 MPa) , com sua respectiva identificação putativa das proteínas por MS.

Spot ID	Identificação putativa	CLONE TOLERANTE (Embrapa 48)		
		Irrigado	Déficit moderado	(%)
Estresse oxidativo				
886	Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic; Flags: Precursor [Glycine max]	0,440 ± 0,107	1,320 ± 0,081	199,841
Fotossíntese				
878	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit rbcS1 [Glycine max]	0,608 ± 0,122	2,516 ± 0,039	313,661
854	Rubisco small subunit rbcS2 [Glycine max]	0,551 ± 0,092	1,918 ± 0,106	248,448
877	Rubisco small subunit rbcS2 [Glycine max]	0,422 ± 0,115	1,302 ± 0,092	208,585
163	Rubisco activase, chloroplast precursor [Vigna radiata]	2,826 ± 0,430	0,270 ± 0,092	90,433
474	PSII Oxygen-evolving enhancer protein 2 precursor	1,208 ± 0,258	0,187 ± 0,109	84,501
815	PSII oxygen-evolving complex protein 3 [Nicotiana tabacum]	2,252 ± 0,362	0,571 ± 0,250	74,622
215	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Chionochloa acicularis]	1,088 ± 0,265	0,301 ± 0,064	72,322
810	PSII Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor [Pisum sativum]	0,853 ± 0,247	0,320 ± 0,142	62,517
858	Rubisco small chain 4, chloroplast precursor [Glycine max]	0,509 ± 0,032	0,200 ± 0,092	60,644
Hipotéticas, desconhecidas ou não notadas				
949	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,785 ± 0,037	0,126 ± 0,081	83,969
228	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,773 ± 0,044	0,197 ± 0,106	74,560
129	Hypothetical protein isoform 2 [Vitis vinifera]	0,713 ± 0,260	0,182 ± 0,126	74,469
873	Unnamed protein product [Vitis vinifera]	0,986 ± 0,081	0,254 ± 0,083	74,270
240	Hypothetical protein OsI_12352 [Oryza sativa Indica Group]	2,525 ± 0,211	0,673 ± 0,097	73,340
38	Unknown [Zea mays]	0,194 ± 0,066	0,056 ± 0,021	71,084
36	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,207 ± 0,004	0,062 ± 0,022	70,299
216	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,990 ± 0,082	0,326 ± 0,095	67,118
807	Unknown [Picea sitchensis]	0,360 ± 0,060	0,121 ± 0,007	66,232
61	Unnamed protein product [Vitis vinifera]	0,118 ± 0,009	0,046 ± 0,082	61,186
100	Hypothetical protein [Vitis vinifera]	0,254 ± 0,048	0,100 ± 0,092	60,557
688	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,828 ± 0,119	0,000 ± 0,000	Ausente
Metabolismo				
151	Glutamine synthetase precursor [Glycine max]	0,389 ± 0,083	0,100 ± 0,131	74,178
265	Lactuca sativa aldehyde oxidase 1	0,903 ± 0,049	0,236 ± 0,033	73,855
144	Glutamine synthetase precursor [Glycine max]	0,515 ± 0,093	0,136 ± 0,095	73,609
793	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein [Zea mays]	0,842 ± 0,109	0,225 ± 0,104	73,265
683	Methionine synthase [Glycine max]	0,361 ± 0,069	0,104 ± 0,069	71,269
222	Ribosomal protein subunit 2 [Phelipanche arenaria]	2,868 ± 0,159	0,842 ± 0,168	70,655
809	Cytosolic malate dehydrogenase [Glycine max]	0,534 ± 0,184	0,182 ± 0,043	65,921
50	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein [Zea mays]	0,160 ± 0,036	0,061 ± 0,052	62,027
831	Cytosolic malate dehydrogenase [Glycine max]	0,361 ± 0,111	0,138 ± 0,026	61,750
79	ATP synthase CF1 beta subunit [Caulerpa taxifolia]	3,113 ± 0,099	1,203 ± 0,108	61,345
109	Alanine aminotransferase 2 [Glycine max]	0,330 ± 0,010	0,130 ± 0,020	60,535
Processamento				
32	Endoplasmic reticulum HSC70-cognate binding protein precursor [Glycine max]	0,284 ± 0,023	0,077 ± 0,018	72,942
35	Endoplasmic reticulum HSC70-cognate binding protein precursor [Glycine max]	0,236 ± 0,010	0,078 ± 0,012	67,094
237	Chloroplast translational elongation factor Tu [Oryza sativa]	0,581 ± 0,060	0,202 ± 0,121	65,283
Sinalização				
33	Calmodulin-2 [Glycine max]	0,237 ± 0,061	0,077 ± 0,008	67,331
Transporte de elétrons				
287	Ferredoxin--NADP reductase, chloroplastic; Short=FNR; Flags: Precursor [Vicia faba]	2,462 ± 0,094	0,581 ± 0,129	76,400

Os valores representam as médias da percentagem em volume (abundancia relativa) ± o desvio padrão de quatro réplicas biológicas. As barras azuis representam em porcentagem o quanto a abundancia protéica aumentou na condição de *deficit* hídrico moderado (-1,0MPa) em relação a condição controle. As barras vermelhas significam o quanto a abundancia protéica diminuiu na condição de *deficit* hídrico moderado (-1,0MPa) em relação a condição controle. As médias diferem entre si segundo teste T student ($p \leq 0,05$).

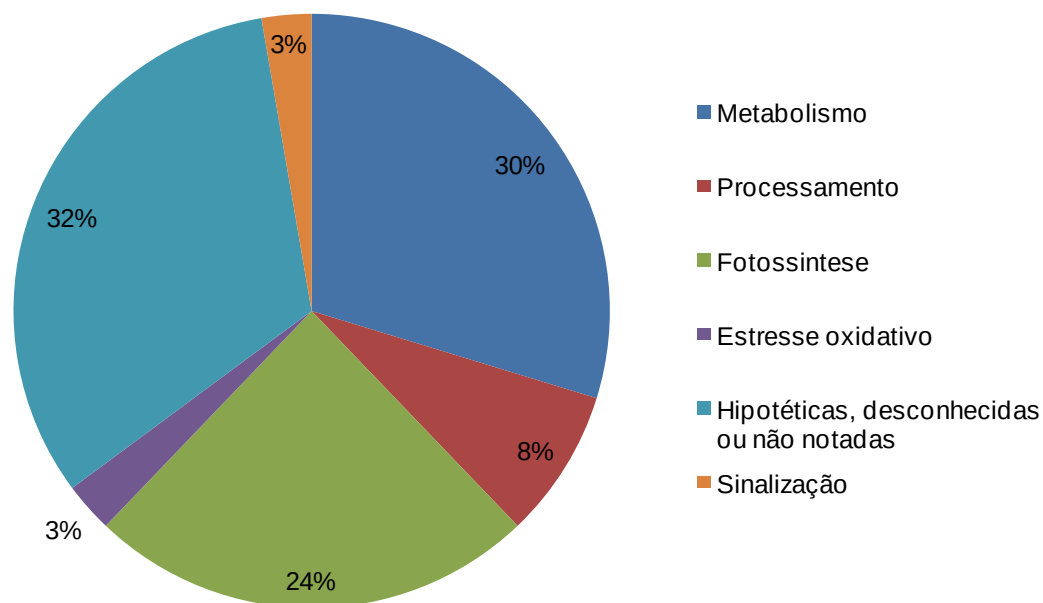


Figura 20. Classificação funcional das proteínas de folhas de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) quando submetido ao *deficit* moderado (-1,0 MPa).

Já os géis contendo as proteínas extraídas de folhas do cultivar Embrapa 48 submetido ao *deficit* hídrico severo (-1,5 MPa) apresentaram 26 proteínas com abundância diferencial em relação ao controle (Figura 21). Desse total, 19 tiveram sua expressão reduzida, 06 aumentada e 01 não foi expressa com a imposição do *deficit* severo (Tabela 6), sendo que das 26 proteínas, 35% foram classificadas em hipotéticas e desconhecidas, 23% relacionadas ao metabolismo, 19% a fotossíntese, 19% ao processamento protéico e 4% ao estresse oxidativo (Figura 22). De maneira geral, sob *deficits* houve aumento na expressão das proteínas relacionadas ao estresse oxidativo, redução das proteínas relacionadas ao metabolismo e redução das proteínas fotossintéticas, com exceção de três isoformas da pequena subunidade da rubisco e duas isoformas da ATP sintase que tiveram expressão aumentada. Portanto, observa-se que sob condições de restrição hídrica existe um alto custo metabólico com redução da atividade fotossintética e aumento de danos oxidativos.

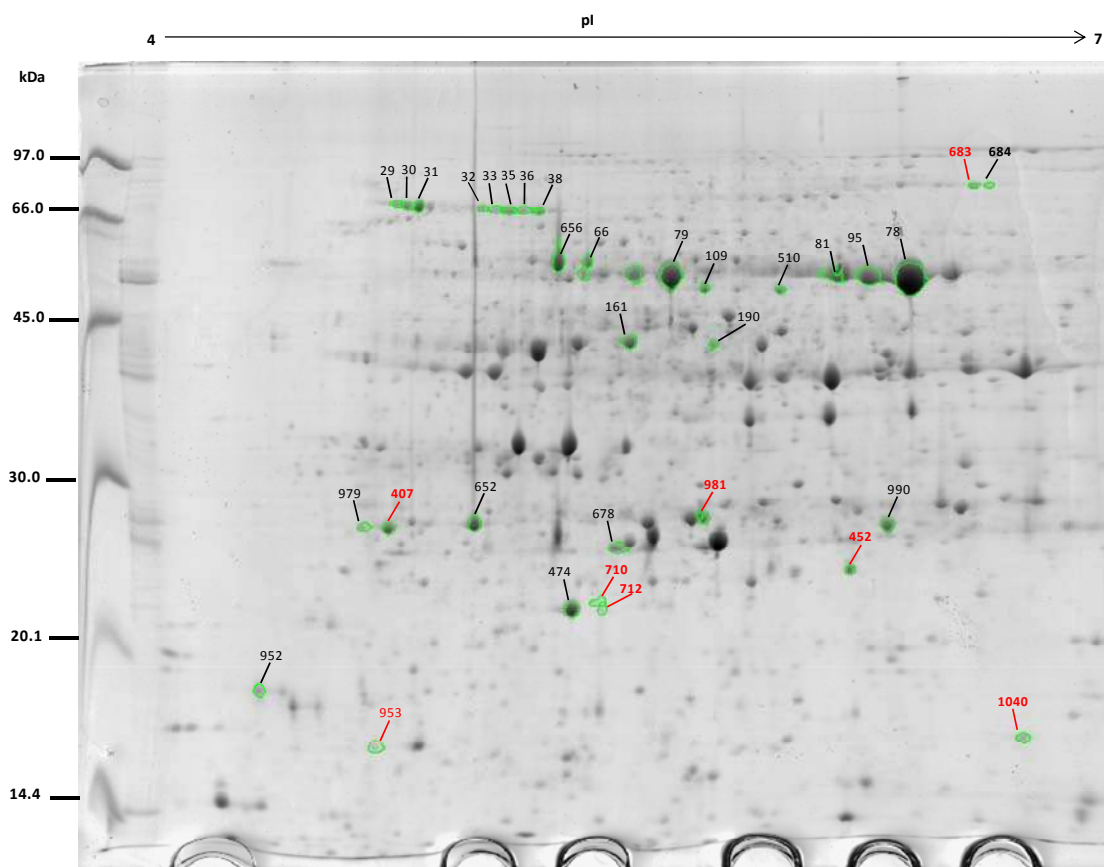


Figura 21. **Proteínas de folhas de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) quando submetido ao deficit severo (-1,5 MPa).** As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 4-7, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com *Coomassie* coloidal. A expressão diferencial foi analisada no *software ImageMaster 2D Platinum*. Legenda: número do “spot” na cor preta significa redução na expressão em relação ao controle (irrigado), número do “spot” na cor vermelha significa aumento na expressão em relação ao controle (irrigado) e número do “spot” na cor azul significa que aquele “spot” foi detectado apenas no tratamento controle (irrigado) em relação ao gel do tratamento sob deficit severo (-1,5 MPa).

Tabela 6. Média da abundancia relativa (% volume) das proteínas responsivas ao *deficit* hídrico severo (-1,5 MPa) , com sua respectiva identificação putativa das proteínas por MS.

Spot ID	Identificação putativa	CLONE TOLERANTE (Embrapa 48)		
		Irrigado	Déficit severo	(%)
Estresse oxidativo				
981	Iron-superoxide dismutase [Glycine max]	0,104 ± 0,069	0,361 ± 0,069	248,054
Fotossíntese				
161	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase alpha 2 [Gossypium hirsutum]	0,614 ± 0,016	0,123 ± 0,024	79,949
95	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Chrysophyllum oliviforme]	2,493 ± 0,264	0,528 ± 0,300	78,809
78	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Falkia repens]	8,422 ± 0,853	1,912 ± 0,103	77,291
474	PSII Oxygen-evolving enhancer protein 2 precursor	1,208 ± 0,258	0,320 ± 0,214	73,49
81	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Falkia repens]	1,531 ± 0,208	0,557 ± 0,095	63,621
Hipotéticas, desconhecidas ou não notadas				
452	Hypothetical protein OsI_38632 [Oryza sativa Indica Group]	0,364 ± 0,192	1,666 ± 0,172	358,186
953	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,306 ± 0,103	1,065 ± 0,288	247,377
407	Hypothetical protein SORBIDRAFT_05g010323 [Sorghum bicolor]	0,302 ± 0,041	0,835 ± 0,019	176,932
29	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,216 ± 0,025	0,044 ± 0,009	79,394
38	Unknown [Zea mays]	0,194 ± 0,066	0,056 ± 0,021	71,084
510	Unknown [Zea mays]	0,622 ± 0,061	0,182 ± 0,084	70,666
36	Conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	0,207 ± 0,004	0,062 ± 0,022	70,299
952	Unknown [Zea mays]	0,443 ± 0,021	0,143 ± 0,015	67,698
684	Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g004825 [Sorghum bicolor]	0,513 ± 0,010	0,213 ± 0,002	58,467
Metabolismo				
979	Maturase K [Boerhavia coccinea]	0,053 ± 0,001	0,191 ± 0,015	263,050
683	Methionine synthase [Glycine max]	0,154 ± 0,087	0,439 ± 0,087	184,481
79	ATP synthase CF1 beta subunit [Caulerpa taxifolia]	3,113 ± 0,099	0,819 ± 0,289	73,680
109	Alanine aminotransferase 2 [Glycine max]	0,330 ± 0,010	0,130 ± 0,020	60,535
66	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	0,358 ± 0,031	0,142 ± 0,064	60,374
656	ATP synthase CF1 alpha subunit [Glycine max]	2,604 ± 0,111	1,040 ± 0,038	60,061
Processamento				
30	Heat shock protein 70 [Cucumis sativus]	0,247 ± 0,018	0,030 ± 0,010	87,860
32	Endoplasmic reticulum HSC70-cognate binding protein precursor [Glycine max]	0,284 ± 0,023	0,077 ± 0,018	72,942
33	Calmodulin-2 [Glycine max]	0,237 ± 0,061	0,077 ± 0,008	67,331
35	Endoplasmic reticulum HSC70-cognate binding protein precursor [Glycine max]	0,236 ± 0,010	0,078 ± 0,012	67,094
31	Heat shock protein, putative [Ricinus communis]	0,475 ± 0,061	0,000 ± 0,000	Ausente

Os valores representam as médias da percentagem em volume (abundancia relativa) ± o desvio padrão de quatro réplicas biológicas. As barras azuis representam em porcentagem o quanto a abundancia protéica aumentou na condição de *deficit* hídrico moderado (-1,0MPa) em relação a condição controle. As barras vermelhas significam o quanto a abundancia protéica diminuiu na condição de *deficit* hídrico moderado (-1,0MPa) em relação a condição controle. As médias diferem entre si segundo teste T student ($p \leq 0,05$).

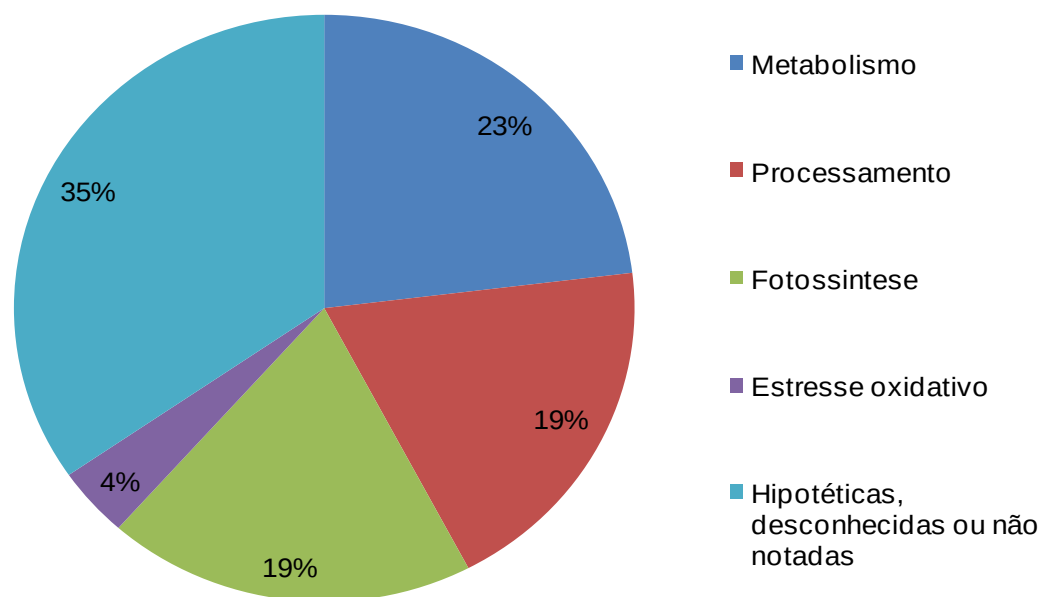


Figura 22. Classificação funcional das proteínas de folhas de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) quando submetido ao *deficit* severo (-1,5 MPa).

Estas modificações nestas isoformas de Rubisco entre os cultivares e no cultivar tolerante sob *deficit* parecem indicar que mudanças pós-traducionais, ou outras mudanças na expressão gênica possam ter papel na aclimação ao estresse hídrico, e não necessariamente uma relação direta com a tolerância a este estresse. Alguns estudos como de Ali & Komatsu (2006), que trabalharam com estresse hídrico em arroz, observam uma redução na expressão de algumas isoenzimas da Rubisco. Já Gorantla (2005) trabalhando com um cultivar Indica de arroz tolerante ao *deficit* hídrico, encontrou aumento na expressão, dentre outros genes responsivos ao *deficit* hídrico, da subunidade maior da Rubisco. Outros trabalhos mostram o aparecimento de fragmentos da Rubisco em decorrência de degradação na presença de estresse hídrico e tratamentos com jasmonato (SALEKDEH *et al.*, 2002; RAKWAL & KOMATSU, 2000).

Estes aumentos, sob condições de *deficit*, na acumulação de algumas isoformas da Rubisco, a princípio parecem ser contraditórios, uma vez que com estresse hídrico há uma diminuição da entrada de CO₂ e conseqüente diminuição da fotossíntese. Por outro lado a enzima Rubisco apresenta não somente a atividade carboxilase como também a atividade oxigenase, processo este chamado fotorrespiração. A fotorrespiração pode

proteger os aparatos fotossintéticos contra a fotoinibição (PARK *et al.*, 1996; OSMOND *et al.*, 1997) por manter a cadeia de transporte de elétrons ativa não deixando elétrons se acumularem e formarem EROs. Em conjunto, o fato de um maior número de modificações no acúmulo da proteína ter sido relacionado com a Rubisco, sugere que o aumento do acúmulo de algumas isoformas, resultante ou não de mudanças pós-traducionais, poderia conferir maior tolerância, ou a melhor aclimação ao provável estresse oxidativo. O exato mecanismo da contribuição da Rubisco permanece ainda obscuro, mas este trabalho salienta a necessidade de um estudo mais pormenorizado da possível contribuição da enzima na resposta das plantas ao estresse hídrico e/ou oxidativo.

Hsps são proteínas geralmente envolvidas em proteção, reparo e degradação de componentes danosos à célula, especialmente proteínas, durante muitos estresses abióticos (PARSELL & LINDQUIST, 1994; DOWNS *et al.*, 1999; HAMILTON & HECKATHORN, 2001). Hsps são sintetizadas e acumuladas em tecidos muito desidratados. Elas auxiliam no dobramento protéico (SCHÖFFL *et al.*, 1998). Sua síntese é aumentada quando proteínas não são corretamente formadas e a quantidade de ATP é limitada (KABAKOV & GABAI, 1997). Hsps são capazes de manter proteínas associadas em um estado competente, dobradas ou não dobradas, desse modo minimizando as agregações protéicas não nativas, ou então marcando como alvos para degradação ou remoção da célula (FEDER & HOFMANN, 1999; HOEKSTRA *et al.* 2001). Durante o *deficit* hídrico, uma estratégia de sobrevivência é também evitar proteínas mal dobradas, mantendo as proteínas em suas conformações funcionais e prevenindo agregação de proteínas não nativas (WANG *et al.* 2003). Um crescente número de estudos sugere que as Hsps interagem com outros mecanismos de resposta a estresses, mecanismos estes que atuam coordenadamente ou sinergicamente para prevenir danos celulares e restabelecer a homeostase celular (WANG *et al.* 2004). O aumento da expressão de Hsp é esperado como elemento de um mecanismo de adaptação ao estresse, visto que nestas condições, o dano oxidativo pode levar ao mal dobramento das proteínas, ativando a expressão destas proteínas com atividade de chaperonas moleculares. Entretanto, o fato de que Hsps terem seus níveis alterados no cultivar tolerante sob *deficit* severo parece indicar a presença de estresse oxidativo no cultivar tolerante, o que corrobora os dados que indicam aumento na peroxidação lipídica, embora menos acentuada que no cultivar sensível.

Na metodologia de identificação utilizada neste trabalho, com o perfil de massa de peptídeos (*Peptide Mass Fingerprinting* – PMF), apenas alguns valores de massa de alguns peptídeos em um mapa peptídico de uma proteína podem ser utilizados em sua identificação. O número reduzido no uso de peptídeos para a identificação de uma proteína, reduz a cobertura da sequência de uma proteína, reduzindo as chances de que sua identificação seja confiável. Em parte isto pode ser devido ao fato de que alguns peptídeos possuem modificações pós-traducionais, e que estas não são previstas nos bancos de dados, impedindo o uso do mesmo pela diferença entre a massa esperada e a obtida. Na tabela abaixo, são apresentados os resultados com o uso dos peptídeos válidos para o PMF (Tabela 7).

Quando a fração do proteoma detectada neste estudo é comparada entre os cultivares na ausência do estresse, observamos maiores níveis de proteínas do metabolismo como as da síntese de aminoácidos [aminotransferase da alanina (AAT), e sintetase da glutamina (GS)], bem como de enzimas fotossintéticas como sintase do ATP (ATPase), redutase da ferredoxina-NADPH (FNR), cinase da fosforibulose (PRK), redutase da ubiquinona-citocromo C (UCR), proteínas do complexo de evolução do oxigênio, carboxilase-oxigenase da ribulose 1,5-difosfato (Rubisco) e a ativase da rubisco. Os maiores níveis destas proteínas no cultivar tolerante em condições normais pode estar associado a maiores níveis de expressão gênica destas proteínas em resposta a uma sinalização associada à maiores taxas de fotossíntese líquida observadas neste cultivar, em relação ao cultivar sensível, na ausência de estresse.

O cultivar tolerante, sob estresse hídrico (Tabela 5), apresenta, em geral, uma redução nos níveis das enzimas acima citadas, com exceção de quatro proteínas da pequena subunidade da Rubisco (Rbss), que apresentaram aumento sob estresse moderado, fato não observado para nenhum destes três genes sob estresse severo, em contraste com a contínua redução nos níveis da subunidade maior da rubisco (Rbcl). Redução na taxa de associação de mRNAs em polissomas já foi observado como uma resposta à seca, fato que não foi significativo naqueles mRNAs induzidos pela seca (BRAY, 2004). Entretanto, quando comparamos ambos os cultivars sob estresse hídrico moderado, observamos no cultivar tolerante (48) maiores níveis das enzimas GS, ATPase, Rubisco e rubisco ativase (Tabela 3) e, adicionalmente, sob estresse hídrico severo, maiores níveis de 2 subunidades da ATPase, 2 da GS, 3 da FNR, 1 da PRK, e 4 da UCR (Tabela 4), indicando que houve menor redução no nível de expressão destes genes, o que pode estar associado a menor redução da interação de seus mRNAs com os

polirribossomas, do que aquela observada no cultivar sensível. Experimentos de RT-PCR com mRNAs isolados ou experimentos de western blot com as proteínas isoladas de polirribossomas, em contraste com aqueles isolados de ribossomas únicos, poderiam fornecer evidências adicionais para esta hipótese. Um contraste interessante foi observado para a proteína malato desidrogenase (MDH), a qual teve menores níveis de expressão no cultivar tolerante, e o oposto, sob estresse hídrico severo. Esta enzima está envolvida no metabolismo do malato, o qual pode ser uma importante válvula metabólica para renovar o NADP cloroplastídico necessário para as reações fotoquímicas, evitando excesso de poder redutor nesta organela, o qual poderia resultar em maior dano oxidativo (BISCHOF *et al.*, 2003). O malato é transportado em altos níveis do cloroplasto para a mitocôndria, onde o poder redutor criado no cloroplasto é utilizado para gerar NADH na mitocôndria, importante contribuição para a bioenergética da folha (BUCHANAN *et al.*, 2000).

Não somente proteínas associadas ao metabolismo tiveram maiores níveis de expressão no cultivar tolerante, em relação ao sensível na presença de estresse. Sob estresse hídrico moderado, observamos no cultivar tolerante, menores reduções na expressão da HSP e na indução da expressão de duas proteínas Fe-SOD foram também observadas (Tabela 4). A menor redução na expressão da HSP pode ter uma contribuição para a maior tolerância a este estresse, visto que é comum o fato de muitas HSP serem induzidas sob estresse hídrico, e que estas proteínas terem importante papel no reempacotamento de proteínas mal dobradas associadas ao efeito do estresse hídrico (DOWNS *et al.*, 1999; HAMILTON & HECKATHORN, 2001). Este dado contrasta com a atividade total da SOD, a qual foi sempre maior no cultivar sensível. Entretanto, o método enzimático utilizado não distingue as isoformas, e não podemos excluir que uma maior concentração da proteína SOD seja real no cloroplasto, ao custo de uma redução na atividade de outras isoformas. Sob estresse hídrico severo, esta hipótese parece ser apoiada pelo fato de termos, no cultivar tolerante, em relação ao sensível, um efeito discrepante entre diferentes proteínas SOD: uma redução em uma proteína, e um aumento em três outras proteínas SOD.

O estudo do proteoma diferencial no cultivar tolerante aqui realizado apresentou somente duas proteínas com possíveis funções na sinalização da resposta ao estresse hídrico. Uma delas é a anexina 1, expressa em maiores níveis sob estresse moderado. Recentes estudos mostram que a superexpressão deste gene está associada a maior tolerância à seca, e que o mutante apresenta diferente resposta na sinalização ao H₂O₂

estomático e que o ABA controla a reação da glutathione com a anexina e, conseqüentemente, sua ligação com o cálcio, sendo provavelmente outro elemento na sinalização do ABA que induz ao aumento do cálcio no citosol (Konopka-Postupolska, 2009). Interessante também é o fato de que esta proteína só detectável no cultivar tolerante, sob estresse moderado, não sendo detectado aumento em sua expressão sob estresse severo. Este fato corrobora a hipótese de que a sinalização a um estresse hídrico esta principalmente concentrada nos momentos iniciais do estresse. A outra proteína de sinalização induzida no cultivar Embrapa 48 sob estresse hídrico é uma proteína da classe do fator transcricional MYB R2R3. Vários membros desta classe tem papel importante na tolerância a seca em Arabidopsis. O gene Myb 96, membro desta família R2R3, medeia a resposta à seca dependente de ABA e plantas superexpressando este gene possuem maior tolerância a seca (SEO *et al.*, 2009). Outro membro, exemplo deste argumento, é o gene MYB15, que quando superexpresso resulta em maior sensibilidade ao ABA e maior tolerância à seca (DING *et al.*, 2009).

Em suma, nossos dados de proteoma diferencial substanciam dados fisiológicos. O cultivar tolerante apresenta maiores taxas fotossintéticas tanto na ausência como na presença de diferentes níveis de estresse, e isto foi correlacionado com maiores níveis de expressão de varias enzimas da fotossíntese. Além dos bem conhecidos papeis da Rubisco e Rubisco ativase, estes dados indicam potencial coeficiente regulatório significativo em potencial do fluxo fotossintético através da regulação da expressão de varias outras enzimas, como PRK, GS, ATPase e elementos do CEO, justificando maiores estudos do efeito da alteração da expressão destas enzimas e seu efeito na fotossíntese.

Os estudos fisiológicos mostraram que o cultivar tolerante tem maior eficiência do uso da água, e esta maior eficiência está relacionada com uma regulação mais eficiente da abertura estomática em resposta à seca sob estresse severo, resultando em uma desidratação mais lenta. Este fato pode estar relacionado a um maior nível de ABA na raiz e/ou folhas na ausência do estresse, e seria importante medir suas concentrações. O fato da menor condutância estomática, mesmo sob ausência de estresse hídrico, pode ser devido a uma maior condutividade hidráulica ou maior profundidade ou massa do sistema radicular, de forma que não haveria necessidade de maior abertura estomática para garantir um fluxo de transporte de água adequado para o resfriamento da folha e nutrição mineral da planta. Estas duas características também poderiam ser, hipoteticamente, explicadas pelo maior nível de ABA. A desidratação mais lenta pode

explicar o menor dano oxidativo, e o menor nível deste, à possível menor indução da expressão das enzimas antioxidativas. Uma evidência que poderia reforçar esta última hipótese seriam experimentos onde se exploraria a correlação entre os níveis endógenos ou exógenos de peróxido de hidrogênio, níveis de ABA e expressão dos genes em estudo.

Entre todos estes mecanismos citados, embora possam ter papel independente, é plausível coloca-los em uma escala temporal. No início estaria a regulação estomática mais eficiente e a capacidade de absorver e/ou transportar água. Isto garantiria menor desidratação, menor *deficit* hídrico, e menor redução da expressão de vários genes fotossintéticos, explicando a maior fotossíntese e *ETR* do cultivar tolerante. Adicionalmente, observa-se que o cultivar tolerante já possui maior nível de expressão das proteínas fotossintéticas e maior fotossíntese, podendo ser o maior nível das mesmas proteínas também um efeito “cascata” da maior concentração natural das enzimas fotossintéticas. A análise genética associada a caracterização fenotípica poderia ajudar na hierarquização e seleção dos mecanismos envolvidos, permitindo escolher aqueles genes que poderiam, na soja, ter maior contribuição a herança quantitativa da tolerância a seca.

Este trabalho ilustra o valor do uso combinado de estudos fisiológicos associados à análise do proteoma diferencial. Melhor encadeamento de evidências é obtido, e uma seleção mais clara de mecanismos de tolerância potenciais pode ser realizada, apesar do limitado número de proteínas de função conhecidas identificadas como diferencialmente expressas. O passo mais importante após este estudo seria a obtenção de evidências mais conclusivas para distinguir a importância dos mecanismos envolvidos e, novamente, novos estudos fisiológicos acoplados a novas metodologias proteômicas poderiam fornecer melhores condições de maior aprofundamento no tema em questão neste trabalho.

Tabela 7. Identificação putativa por *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) de proteínas de folha de soja por MALDI-TOF-TOF

SID	Protein identification [species]	T. Mr/pI	MO	PM	SC (%)	Numero de Acesso	Banco de Dados	Metodo ID
29	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	37517/7.64	70	11	31	gi 223507406	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
30	Heat shock protein 70 [Cucumis sativus]	75480/5.15	164	16	25	gi 1143427	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
31	heat shock protein, putative [Ricinus communis]	75431/5.35	131	23	30	gi 223534226	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
32	Endoplasmic reticulum HSC70-cognate binding protein precursor [Glycine max]	73822/5.15	92	14	21	gi 2642238	NCBIInr SWISS-PROT	MALDI-TOF-TOF
33	Calmodulin-2 [Glycine max]	16878/4.11	39	4	30	CALM2_SOYBN		MALDI-TOF-TOF
35	Endoplasmic reticulum HSC70-cognate binding protein precursor [Glycine max]	73822/5.15	88	15	23	gi 218199537	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
36	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	37517/7.64	72	12	37	gi 223507406	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
38	unknown [Zea mays]	46413/8.48	70	9	24	gi 224029795	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
50	ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein [Zea mays]	14676/9.78	59	7	45	gi 195627658	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
61	unnamed protein product [Vitis vinifera]	82205/6.18	68	15	21	gi 157345364	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
64	predicted protein [Micromonas pusilla CCMP1545]	148047/8.96	64	22	17	gi 226460779	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
66	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	10615/9.97	76	6	71	gi 115502358	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
79	ATP synthase CF1 beta subunit [Caulerpa taxifolia]	14446/5.40	60	8	52	gi 219964549	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
70	hypothetical protein [Vitis vinifera]	25360/9.67	48	5	28	gi 147857970	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
71	hypothetical protein SORBIDRAFT_09g004780 [Sorghum bicolor]	84711/5.68	62	12	20	gi 242089665	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
81	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Falkia repens]	52003/6.20	113	17	33	gi 21634087	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
95	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Chrysophyllum oliviforme]	52005/6.14	130	15	32	gi 37194725	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
78	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Falkia repens]	52003/6.20	204	19	43	gi 21634087	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
100	hypothetical protein [Vitis vinifera]	22800/5.50	63	7	40	gi 147776335	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
109	alanine aminotransferase 2 [Glycine max]	53863/5.42	127	20	49	gi 158122137	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF

112	hypothetical protein SORBIDRAFT_01g013800 [Sorghum bicolor]	25399/9.32	58	5	21	gi 242033585	NCBI	MALDI-TOF-TOF
148	cytosolic glutamine synthetase GSbeta1 [Glycine max]	39138/5.48	76	9	30	gi 125550665	NCBI	MALDI-TOF-TOF
144	glutamine synthetase precursor [Glycine max]	47948/6.73	92	13	39	gi 13877511	NCBI	MALDI-TOF-TOF
129	PREDICTED: hypothetical protein isoform 2 [Vitis vinifera]	23816/7.68	60	7	38	gi 225433648	NCBI	MALDI-TOF-TOF
147	Os07g0622700 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	36403/8.51	57	8	26	gi 115473437	NCBI	MALDI-TOF-TOF
140	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Prunus armeniaca var. ansu]	52018/6.63	90	13	27	gi 15987084	NCBI	MALDI-TOF-TOF
174	leucine-rich repeat receptor-like kinase At1g09970 [Arabidopsis thaliana]	36335/5.76	68	9	24	gi 62321062	NCBI	MALDI-TOF-TOF
172	phosphoribulose kinase, putative [Ricinus communis]	45221/5.83	68	13	29	gi 223541989	NCBI	MALDI-TOF-TOF
163	Rubisco activase, chloroplast precursor [Vigna radiata]	48042/7.57	123	13	40	gi 10720249	NCBI	MALDI-TOF-TOF
165	Rubisco activase, chloroplast precursor [Vigna radiata]	48042/7.57	123	13	40	gi 10720249	NCBI	MALDI-TOF-TOF
161	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase alpha 2 [Gossypium hirsutum]	46944/4.84	80	11	30	gi 78100212	NCBI	MALDI-TOF-TOF
151	glutamine synthetase precursor [Glycine max]	47948/6.73	67	12	28	gi 13877511	NCBI	MALDI-TOF-TOF
215	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Chionochloa acicularis]	1851/5.91	62	4	100	gi 167782336	NCBI	MALDI-TOF-TOF
216	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	37517/7.64	71	10	33	gi 223507406	NCBI	MALDI-TOF-TOF
259	PREDICTED: similar to thioredoxin-related protein isoform 2 [Vitis vinifera]	30695/8.09	74	10	29	gi 225440205	NCBI	MALDI-TOF-TOF
234	predicted protein [Populus trichocarpa]	43420/6.93	89	11	26	gi 224096552	NCBI	MALDI-TOF-TOF
254	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	37517/7.64	71	10	38	gi 223507406	NCBI	MALDI-TOF-TOF
240	hypothetical protein OsI_12352 [Oryza sativa Indica Group]	7143/10.25	58	5	61	gi 218193198	NCBI	MALDI-TOF-TOF
237	chloroplast translational elongation factor Tu [Oryza sativa]	50551/6.05	62	7	24	gi 6525065	NCBI	MALDI-TOF-TOF
222	ribosomal protein subunit 2 [Phelipanche arenaria]	21334/9.32	77	12	42	gi 83745361	NCBI	MALDI-TOF-TOF
265	Lactuca sativa aldehyde oxidase 1	151096/6.34	80	13	10	gi 84579422	NCBI	MALDI-TOF-TOF
228	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	37517/7.64	76	11	38	gi 223507406	NCBI	MALDI-TOF-TOF
287	Ferredoxin--NADP reductase, chloroplastic; Short=FNR; Flags: Precursor [Vicia faba]	40838/8.70	99	18	37	gi 729479	NCBI	MALDI-TOF-TOF

284	Chain A, Wild-Type Pea Fnr	35060/6.54	77	14	36	gi 4930123	NCBI	MALDI-TOF-TOF
474	PSII Oxygen-evolving enhancer protein 2 precursor	19825/4.81	75	12	35	gi 16995778	NCBI	MALDI-TOF-TOF
451	predicted protein [Populus trichocarpa]	42891/9.88	66	9	31	gi 224053192	NCBI	MALDI-TOF-TOF
454	Os02g0762300 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	41702/8.86	64	6	18	gi 115448847	NCBI	MALDI-TOF-TOF
452	hypothetical protein OsI_38632 [Oryza sativa Indica Group]	12206/10.42	44	5	45	gi 125536931	NCBI	MALDI-TOF-TOF
374	triosephosphate isomerase [Glycine max]	27415/5.87	145	14	53	gi 77540216	NCBI	MALDI-TOF-TOF
335	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Hypserpa nitida]	52058/6.04	132	19	31	gi 229464412	NCBI	MALDI-TOF-TOF
498	unknown [Picea sitchensis]	18083/5.89	59	5	34	gi 116780837	NCBI	MALDI-TOF-TOF
407	hypothetical protein SORBIDRAFT_05g010323 [Sorghum bicolor]	46371/8.99	63	11	38	gi 242068295	NCBI	MALDI-TOF-TOF
1437	ATP synthase beta subunit [Nepenthes alata]	53059/5.09	71	13	30	gi 6017816	NCBI	MALDI-TOF-TOF
1618	predicted protein [Ostreococcus lucimarinus CCE9901]	84020/6.65	63	10	16	gi 145352412	NCBI	MALDI-TOF-TOF
1637	hypothetical protein OsI_18273 [Oryza sativa Indica Group]	41096/6.53	63	10	30	gi 125550665	NCBI	MALDI-TOF-TOF
658	ATP synthase CF1 alpha subunit [Glycine max]	55776/5.15	69	14	27	gi 91214148	NCBI	MALDI-TOF-TOF
656	ATP synthase CF1 alpha subunit [Glycine max]	55776/5.16	127	18	37	gi 91214148	NCBI	MALDI-TOF-TOF
602	ATP synthase beta subunit [Utricularia biflora]	51814/5.09	98	13	25	gi 7688411	NCBI	MALDI-TOF-TOF
689	ribulose-biphosphate carboxylase [Mangonia tweediana]	51846/6.05	159	23	42	gi 209417523	NCBI	MALDI-TOF-TOF
671	ribulose bisphosphate carboxylase large subunit [Psoralea aculeata]	52062/6.04	139	23	39	gi 125991557	NCBI	MALDI-TOF-TOF
691	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase large subunit [Rhynchosia minima]	51975/6.14	166	20	38	gi 18157319	NCBI	MALDI-TOF-TOF
799	hypothetical protein [Vitis vinifera]	42045/7.58	62	11	26	gi 147797309	NCBI	MALDI-TOF-TOF
809	PSII Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor [Pisum sativum]	35100/6.25	91	9	27	gi 131384	NCBI	MALDI-TOF-TOF
821	AT1G66510 [Arabidopsis thaliana]	25242/6.45	59	8	38	gi 227202636	NCBI	MALDI-TOF-TOF
822	hypothetical protein [Vitis vinifera]	36723/8.02	71	12	34	gi 147845283	NCBI	MALDI-TOF-TOF
890	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	37517/7.64	66	10	29	gi 223507406	NCBI	MALDI-TOF-TOF

885	hypothetical protein SORBIDRAFT_05g010323 [Sorghum bicolor]	46371/8.99	60	12	34	gi 242068295	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
887	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	9604/5.49	73	7	61	gi 223536954	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
886	Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic; Flags: Precursor [Glycine max]	27881/5.60	69	9	35	gi 134646	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
896	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	123963/8.64	70	13	13	gi 223527844	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
892	annexin, putative [Ricinus communis]	36405/6.81	59	10	40	gi 223546996	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
822	Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic; Flags: Precursor [Glycine max]	27881/5.60	58	7	33	gi 134646	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
919	predicted protein [Micromonas sp. RCC299]	164898/5.23	64	22	16	gi 226517782	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
847	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	37517/7.64	62	10	31	gi 223507406	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
952	unknown [Zea mays]	46413/8.48	64	8	20	gi 224029795	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
953	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	9764/9.3	58	7	61	gi 223549561	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
878	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit rbcS1 [Glycine max]	20220/8.87	108	11	58	gi 10946375	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
383	Elongation factor 2 (EF-2) [Beta vulgaris]	94708/5.93	63	7	49	O23755	SwissProt	MALDI-TOF-TOF
611	AT5G50010 [Arabidopsis thaliana]	31261/5.44	57	7	26	gi 227202838	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
725	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	37517/7.64	64	10	29	gi 223507406	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
683	methionine synthase [Glycine max]	84401/5.93	141	21	30	gi 33325957	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
684	hypothetical protein SORBIDRAFT_04g004825 [Sorghum bicolor]	6932/9.30	48	4	63	gi 242060674	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
732	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Croton yucatanensis]	52205/6.09	98	16	37	gi 126166052	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
873	unnamed protein product [Vitis vinifera]	29280/6.06	101	17	39	gi 157335145	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
793	ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein [Zea mays]	14676/9.78	50	7	43	gi 195627658	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
809	cytosolic malate dehydrogenase [Glycine max]	35846/6.32	68	10	31	gi 42521311	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
831	cytosolic malate dehydrogenase [Glycine max]	35846/6.33	63	11	34	gi 42521311	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
833	hypothetical protein SORBIDRAFT_02g031280 [Sorghum bicolor]	19264/4.56	60	5	40	gi 242050004	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
807	unknown [Picea sitchensis]	18942/6.30	48	6	34	gi 116792186	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF

878	Chain A, Wild-Type Pea Fnr	35060/6.54	84	15	44	gi 4930123	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
916	unknown [Zea mays]	46413/8.48	53	8	21	gi 224029795	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
925	ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein [Zea mays]	14676/9.78	54	5	33	gi 195627658	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
979	maturase K [Boerhavia coccinea]	32576/9.98	61	7	29	gi 15340912	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
1014	iron-superoxide dismutase [Glycine max]	27506/5.45	77	10	37	gi 37654895	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
975	iron-superoxide dismutase [Glycine max]	27506/5.45	92	12	43	gi 37654895	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
996	predicted protein [Populus trichocarpa]	46287/9.41	66	12	26	gi 224077440	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
965	granule-bound starch synthase I [Eragrostis advena]	25908/8.52	62	11	55	gi 46326782	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
981	iron-superoxide dismutase [Glycine max]	27506/5.45	71	8	34	gi 37654895	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
1003	predicted protein [Populus trichocarpa]	26058/8.97	64	7	37	gi 224103329	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
973	Full=Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic; Flags: Precursor [Glycine max]	27881/5.60	74	10	39	gi 134646	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
966	hypothetical protein SORBIDRAFT_04g010090 [Sorghum bicolor]	22728/6.07	56	6	38	gi 242064756	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
949	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	37517/7.64	65	11	35	gi 223507406	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
945	hypothetical protein OsJ_14092 [Oryza sativa Japonica Group]	12140/9.69	56	7	58	gi 222628516	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
1112	nucleoside diphosphate kinase [Glycine max]	16402/6.91	73	7	41	gi 26245395	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
1096	ubiquinol-cytochrome c reductase complex 14 kDa protein [Zea mays]	14676/9.78	59	7	43	gi 195627658	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
1097	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]	37517/7.64	54	9	26	gi 223507406	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
906	hypothetical protein MtrDRAFT_AC149204g22v2 [Medicago truncatula]	11312/7.82	57	4	30	gi 124359573	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
930	Os04g0490800 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	39811/6.75	66	10	30	gi 115459134	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
907	R2R3-MYB transcription factor [Arabidopsis thaliana]	5365/10.15	63	5	95	gi 2832490	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
125	unknown [Zea mays]	46413/8.48	70	8	20	gi 224029795	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
126	predicted protein [Populus trichocarpa]	42891/9.87	56	8	28	gi 224053192	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
147	ATP synthase beta subunit [Schoepfia schreberi]	30447/5.12	70	10	31	gi 14718214	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF

143	ATP synthase, beta subunit [<i>Iphigenia indica</i>]	52668/5.16	65	11	21	gi 16943743	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
656	conserved hypothetical protein [<i>Ricinus communis</i>]	37517/7.64	68	11	35	gi 223507406	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
651	unnamed protein product [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	66243/4.95	63	9	14	gi 9294322	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
688	conserved hypothetical protein [<i>Ricinus communis</i>]	37517/7.64	73	10	29	gi 223507406	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
854	Rubisco small subunit rbcS2 [<i>Glycine max</i>]	20220/8.87	91	6	28	gi 10946377	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
858	Rubisco small chain 4, chloroplast precursor [<i>Glycine max</i>]	20232/8.87	301	6	26	gi 132113	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
877	Rubisco small subunit rbcS2 [<i>Glycine max</i>]	20220/8.87	175	15	57	gi 10946377	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
815	PSII oxygen-evolving complex protein 3 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	35377/5.89	85	9	31	gi 505482	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF
510	unknown [<i>Zea mays</i>]	46413/8.48	72	7	22	gi 224029795	NCBIInr	MALDI-TOF-TOF

SID: Identificação do 'spot': T.Mr/pI: Peso molecular e pI teórico; MO: Pontuação MOWSE; PM: número de peptídeos que deram Match; SC: percentual de cobertura da sequência; Acesso: número de acesso; Método ID: método de identificação. A proteína com melhor correspondência no banco de dados foi classificada com a espécie em que foi identificada e com seu número de acesso.

5 CONCLUSÕES

O cultivar Embrapa 48 foi confirmado como cultivar tolerante devido: retardar o processo de desidratação, apresentar menores efeitos nas trocas gasosas e dano oxidativo em folhas com uma maior economia hídrica em decorrência de sua maior fotossíntese e menor transpiração. O fechamento estomático permitiu um controle eficiente da perda de água e que as reduções nas taxas fotoquímicas não foram decorrentes de possíveis danos na maquinaria de absorção de energia luminosa, visto a ausência de alterações no parâmetro F_v/F_m . O cultivar Embrapa 48 apresentou maior capacidade de transferir mais eficientemente a energia absorvida para o processo fotossintético, evidenciado pelos maiores valores de *ETR* que o cultivar BRS 16 na ausência e presença de *deficit* hídrico. Os dados aqui mostrados sugerem que no cultivar sensível está sendo gerado um maior excesso de poder redutor evidenciado pela redução mais acentuada tanto na *ETR* quanto no $\square$ FSII, além de ter apresentado maior dissipação térmica, sendo provavelmente responsáveis pela maior formação de EROs e peroxidação lipídica nesse cultivar.

A análise proteômica realizada foi capaz de produzir resultados de expressão diferencial do sistema estudado, confirmando seu uso como ferramenta importante na biologia de sistemas. Esta ferramenta mostrou que existem diferenças expressivas na abundância de várias proteínas entre os cultivares contrastantes, e que o cultivar tolerante apresenta maiores taxas fotossintéticas tanto na ausência como na presença de diferentes níveis de estresse, e isto foi correlacionado com maiores níveis de expressão de várias enzimas da fotossíntese. Além das bem conhecidas Rubisco e Rubisco ativase, estes dados indicam potencial coeficiente regulatório significativo do fluxo fotossintético através da regulação da expressão de várias outras enzimas, como PRK, GS, ATPase e elementos do CEO, justificando maiores estudos do efeito da alteração da expressão destas enzimas e seu efeito na fotossíntese. A análise proteômica diferencial se destacou como uma importante ferramenta, possibilitando traçar uma visão geral do quadro a ser estudado. Desta forma, o proteoma diferencial das folhas da soja possibilitou traçar uma visão geral acerca dos possíveis mecanismos envolvidos e lançando novas perspectivas de estudos futuros em mecanismos pontuais, rotas metabólicas específicas, ensaios de atividades dessas proteínas com abundância diferencial importantes para consolidação dos resultados deste trabalho.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Disponível em: http://www.abiove.com.br/estatistica_br_0405.html. Acessado em abril de 2009.

AGHAEI, K.; EHSANPOUR, A.A.; KOMATSU, S. Proteome analysis of potato under salt stress. *J Proteome Res.*, 7:4858–68, 2008.

ARTLIP, T. S.; WISNIEWSKI, M. E. Induction of proteins in response to biotic and abiotic stresses. In: PESSARAKLI, M. (ed.). *Handbook of Plant and Crop Physiology*. New York, USA: Marcel Dekker, Inc., p. 657-680, 2001.

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

ASHCROFT, A. E. (2003). Protein and peptide identification: the role of mass spectrometry in proteomics. *Natural Product Reports*, 20 (2):202-215.

BAE, M.S.; CHO, E.J.; CHOI, E.; PRK, O.K. Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J.* 36:652–63, 2003.

BALL, M.C.; BUTTERWORTH, J.A.; RODEN, J.S.; CHRISTIAN, R.; EGERTON, J.J.G. Applications of chlorophyll fluorescence to forest ecology. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22:311-319, 1994.

BATISTA, R.; MARTINS, I.; JENÖ, P.; RICARDO, C.P.; OLIVEIRA, M.M. A proteomic study to identify soya allergens - The human response to transgenic versus non-transgenic soya samples. *Int Arch Allergy Imm*, v. 144, p.29-38, 2007.

BEEVER, D. Os transgênicos e o futuro da agricultura. *Biotecnologia e Desenvolvimento*. v.15, p. 4-7, 2000.

BERLATO, M. A. Carta de aptidão climática da soja no Rio Grande do Sul. In: MIYSAKA, Shiro & Medina, Júlio César. *A Soja no Brasil*. Ed 1. São Paulo, 1062p., 1981.

BISCHOF, K.; *et al.* Oxidative stress and enzymatic scavenging of superoxide radicals induced by solar UV-B radiation in *Ulva* canopies from southern Spain. *Sci. Mar.*, vol. 67, n.3, p.353-359, 2003.

BOR, M.; OZDEMIR, F.; TURKAN, I. The effects of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science*, v.164, p.77-84, 2003.

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*, 72:248-254, 1976.

BRAY, E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 55(407): p.2331-2341, 2004.

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

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

BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W. JONES, R.L. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p.

CAMBRAIA, J. Aspectos bioquímicos, celulares e fisiológicos dos estresses nutricionais em plantas. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E. DE L.; WI LLADINO, L.G.; CAVALCANTE, U.M.T. (eds.). *Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas*. Recife: UFRPE, 2005. cap. 2 , p. 95-104.

CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis *Proteomics* 5:2497–2507, 2005.

DOGAN, E.; KIRNAK, H.; COPUR, O. Deficit irrigations during soybean reproductive stages and CROPGRO-soybean simulations under semi-arid climatic conditions. *Field Crops Res.* 103:154 – 159, 2007.

DUNN, M.J.; CORBETT, J.M.; Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* v. 271, p.177-203, 1996.

EMBRAPA SOJA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Sistema de alerta. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/alerta>. Acessado em fevereiro de 2009.

FAGERIA N. K. Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas. 1 ed. Brasília: Departamento de Publicações EMBRAP-CNPAF, p.381-392, 1989.

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E. Stages on soybean development. Ames: Iowa State University/Cooperative Extention Service, 1977. 11p. (Special Report, 80).

FRANCO, A.C.; MATSUBARA, S.; ORTHEN, B. Photoinhibition, carotenoid composition and the co-regulation of photochemical and non- photochemical *quenching* in neotropical savanna trees. *Tree Physiology*, 27:717-725, 2002.

GAVIN, A.C.; BOSCHE, M.; KRAUSE, R.; GRANDI, P.; MARZIOCH, M.; BAUER, A.; SCHULTZ, J.; RICK, J.M.; MICHON, A.M.; CRUCIAT, C.M. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, v. 415, p. 141–147, 2002.

GIANNOPOLITIS, I.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higer plants. *Plant Physiol.* 59, 309-314, 1977.

GLISH, G.L. & VACHET, R.W. Review - The basic of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature*, 2: 140-150, 2003.

GOMES JUNIOR, R.A.; MOLDES, C.A.; DELITE, F.S.; POMPEU, G.B.; GRATÃO, P.L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere*, 65:1330-1337, 2006.

HAJDUCH, M.; GANAPATHY, A.; STEIN, J.W.; THELEN, J.J. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. *Plant Physiology*, v.137, p.1397-1419, 2005.

HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 84, 450-455, 1987.

HENZEL, W.J.; WATANABE, C.; STULTS, J.T. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* v. 14, p.931-942, 2003.

HODGES, D.M.; DELOMG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207:604-611, 1999

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

INMAN-BAMBER, N. G. Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. *Field Crops Research*, v. 89, p. 107-122, 2004.

ISHIDA, H.; MAKINO, A.; MAE, T. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 5222-5226.

JAMES, P.; QUADRONI, M.; CARAFOLI, E.; GONNET, G. Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem. Bioph. Research Commun.* v.195, p.58-64, 1993.

JOHNSSON, A.P. Review – Mass spectrometry for protein and peptide characterization. *Cellular and Molecular Life Sciences.*, 58: 868-884, 2001.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57:315-319, 1976.

KRISHNAN, H.B.; NATARAJAN, S.S.; MAHMOUD, A.A.; NELSON, R.L. Identification of glycinin and beta-conglycinin subunits that contribute to the increased protein content of high-protein soybean lines. *J. Agric. Food Chem.* v. 55, p.1839-1845, 2007.

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

LAKSHMI, P. M.; SATISH, K. G.; LAM-SON, P. T.; HENRY, T. N. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant Cell Physiology*. 50 (7): p.1260–1276, 2009.

LEI, Z.; ELMER, A.M.; WATSON, B.S.; DIXON, R.A.; MENDES, P.J.; SUMNER, L.W. A two-dimensional electrophoresis proteomic reference map and systematic identification of 1367 protein from a cell suspension culture of the model legume *Medicago truncatula*. *Mol Cell Proteomics*, 4:1812–25, 2005.

LIN, C.C.; KAO, C.H. Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 30:151-155, 2000.

LOCKHART, J.D.; WINZELER, A.E. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*. 405:827–35, 2000.

LUDLOW, M.M. & MUCHOW, R.C. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. *Adv. Agron*. 43:107–153, 1990.

MANN, M.; HENDRICKSON, R.C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Bioch.* v. 70, p.437-473, 2001.

MANN, M.; HENDRICKSON, R.C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*. 70: 437-473, 2001.

MECKEL, L.; EGLI, D.B.; PHILLIPS, R.E.; RADCLIFFE, D.; LEGGETT, J.E. Effect of moisture stress on seed growth in soybeans. *Agron. J.* 75:1027-1031, 1984.

MESQUITA, R. O.; SOARES, E.A.; LOUREIRO, M.E.; RAMOS, H.J.O. Otimização de extração de proteínas de folhas e raízes de soja para análise proteômica. In: XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2009, Fortaleza. Resumos do XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2009.

MILLAR, A.H.; HEAZLEWOOD, J.L.; KRISTENSEN, B.K.; BRAUN, H.P.; MOLLER, I.M. The plant mitochondrial proteome. *Trends Plant Sci.* 10:36–43, 2005.

MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. A soja no Brasil. 1 ed. São Paulo: ITAL, p.1-174, 1981.

MOONEY, B.P.; THELEN, J.J. High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification. *Phytochemistry*, v.65, p.1733–1744, 2004.

MÜLLER, M.; GRAS, R.; APPEL, R.D.; BIENVENUT, W.V.; HOCHSTRASSER, D.F. Visualization and analysis of molecular scanner peptide mass spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* v. 13, p.221-231, 2002.

- MUNNÉ-BOSCH S.; ALEGRE, L. Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta*, 214:608-615, 2002.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* v. 25, p. 239–250, 2002.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiol.* 22, 867-880, 1981.
- NATARAJAN, S.; XU, C.; BAE, H.; BAILEY, B.A.; CREGAN, P.; CAPERNA, T.J.; GARRETT, W.M.; LUTHRIA, D. Proteomic and genetic analysis of glycinin subunits of sixteen soybean genotypes. *Plant Physiol Bioch*, v. 45 (6-7), p.436-444, 2007.
- NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A.L. Water management. *In* FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, ed, *Tropical soybean: Improvement and production*. FAO - Plant Production and Protection Series, 27, Rome, Italy, pp 153-160, 1994.
- NOCTOR, G.; DEPAEPE, R.; FOYER, C.H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*, 12:125-134, 2007.
- PAN, S.Q.; CAETER, C.J.; RAIKHEL, N.V. Understanding protein trafficking in plant cells through proteomics. *Exp Rev Proteome*. 2:781–92, 2005.
- PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomics. *Nature*, 405:837–45, 2000.
- PANFILOV, O.; LANE, B. Peptide mass fingerprinting from wet and dry two-dimensional gels and its application in proteomics. *Anal. Biochem.* v. 307, p.393-395, 2002.
- PEIXOTO, P.H.P. et al. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. v.11, n.3, p.137-143, 1999.
- PORUBLEVA, L.; VANDER VELDEN, K.; KOTHARI, S.; OLIVER, D.J.; CHITNIS, P.R. The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. *Electrophoresis* 22:1724-1738, 2001.
- RAPPSILBER, J.; MANN, M. What does it mean to identify a protein in proteomics. *Trends Biochem Sci*, v. 27, p. 74-78, 2002.
- ROBERTSON, M. J. et al. Physiology and productivity of sugarcane with early and mid-season water deficit. *Field Crops Research*, v. 64, p. 211-227, 1999.
- SAKAI, T. & KOGISO, M. Soyisoflavones and immunity. *J . Med. Invest.* 55 : 167–173, 2008.

- SARAVANAN, R.S.; ROSE, J.K. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* 2004;4:2522–32.
- SCHOLANDER, P.F.; HAMMEL, H.T.; BRADSTREET, E.D.; HEMINGSSEN, E.A. Sap pressure in vascular plants. *Science*, 148:339-345, 1965.
- SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. In: *Ecophysiology of photosynthesis*. (eds.) Schulze, E.D.; Caldwell, M.M. Springer, New York, 1994. 49
- SETSUOKO, K.; NAGIB, A. Soybean proteomics and its application to functional analysis. *Journal of Proteomics*, 72: p.325–336, 2009.
- SHEN, S.; MATSUBAE, M.; TAKAO, T.; TANAKA, N.; KOMATSU, S. A preteomics analysis of leaf sheath from rice. *J. Biochem.*, v.132, p. 613-620, 2002.
- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, v.1, n.6:2856-2860, 2006.
- SHI, F.; YAMAMOTO, R.; SHIMAMURA, S.; HIRAGA, S.; NAKAYAMA, N.; NAMAMURA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase 2 (cAPX 2) is involved in the soybean response to flooding. *Phytochemistry*, 69:1295–303, 2008.
- SHINOSAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOSAKI, K. Gene networks involved in drought response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v.58, p.221-227, 2007
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 7, p. 161-167, 1996.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* v. 115, p. 327-334, 1997.
- SMIRNOFF, N. 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. Pp. 217-243 in *Environment and plant metabolism, flexibility and acclimation*. (N. Smirnov, ed.). Bios Scientific Publishers, Oxford, U.K.
- SMIT, M. A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. *Field Crops Research*, v. 98, p. 91-97, 2006.
- SOARES, C. Q. G. Proteômica diferencial e caracterização fisiológica de dois clones de *Coffea canephora* sob déficit hídrico. Dissertação de Mestrado – UFV, 2008, 110p.
- SOYSTATS. Disponível em: <http://www.soystats.com/>. Acessado em novembro de 2008.
- SPECHT, J.E.; HUME, D.J.; KUMUDINI, S.V. Soybean yield potential-a genetic and physiological perspective. *C rop Sci.* 39:1560-1570, 1999.

STEUDLE, E. Water uptake by roots: effects of water deficit. *Journal of Experimental Botany*, v. 51, n. 350, p. 1531-1542, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 719 p. 2004.

TAKAHASHI, S.; BAUWE, H.; BADGER, M. Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair but not acceleration of damage process in *Arabidopsis* sp. *Plant Physiology*, 144:487-494, 2007.

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*, 108: 398-404, 2000

THELEN, J.; OHLROGGE, J. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. *Metab Eng.*, 4:12–21, 2002.

THELEN, J.J. Introduction to proteomics: a brief historical perspective on contemporary approaches. *Plant Proteomics*, Springer-Verlag, Germany, Eds. Thelen JJ, Samaj J pp. 1–13, 2007.

THIEDE, B., W. HOHENWARTER, et al. (2005). Peptide mass fingerprinting. *Methods a Companion to Methods in Enzymology*, 35 (3):237-47.

TURNER, N.C. 1979. Drought resistance and adaptation to water deficits in crop plants. In *Stress physiology in crop plants*. (H. Mussel, R.C. Staples, eds.) Wiley Interscience, New York, p.468-478.

TURNER, N.C. Further progress in crop water relations. *Advances in Agronomy*. 58, p. 293-338, 1997.

VAN WIJK, K.J. Plastid proteomics. *Plant Physiol Biochem*. 42:963–77, 2004.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance 218:1-14, 2003.

WATSON, B.S.; ASIRVATHAM, V.S.; WANG, L.; SUMNER, L.W. Mapping the Proteome of Barrel Medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiology*, 131:1104-1123, 2003.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144:307-314, 1994.

WESTERMEYER, R.; NAVEN, T. *Proteomics in practice – A laboratory manual of proteome analysis*. Weinheim:Wiley-VCH, 315 p, 2002.

WU, C.C.; MACCOSS, M.J.; MARDONES, G.; FINNIGAN, C.; MOGELSVANG, S.; YATES III, J.R. Organellar proteomics reveals Golgi arginine dimethylation. *Mol Biol Cell*. 15:2907–19, 2004.

XU, C.; GARRETT, W.M.; SULLIVAN, J.; CAPERNA, T.J.; NATARAJAN, S. Separation and identification of soybean leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Phytochemistry*, v. 67, p. 2431–2440, 2006.

ZHEN, Y.; QI, J.L.; WANG, S.S.; SU, J.; XU, H.G.; ZHANG, M.S. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. *Physiol Plant*, 131:542–54, 2007.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 53, p. 247-273, 2002.