

JULIANO MENDONÇA RODRIGUES

**METABOLÔMICA DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE SOJA (*Glycine max*
L. Merrill) EXPRESSANDO BIP EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM
Pseudomonas syringae pv. *tomato***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2017

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

T

R696m
2017
Rodrigues, Juliano Mendonça, 1991-
Metabolômica de plantas transgênicas de soja (*Glycine max*
L. Merrill) expressando BiP em resposta à inoculação com
Pseudomonas syringae pv. tomato / Juliano Mendonça
Rodrigues. – Viçosa, MG, 2017.
xix, 79f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos. Dissertação
(mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Inclui
bibliografia.

1. Soja. 2. *Pseudomonas syringae* pv. tomato. 3. Plantas
transgênicas. 4. Fitopatógenos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

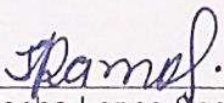
CDD 22 ed. 633.34

JULIANO MENDONÇA RODRIGUES

**METABOLÔMICA DE PLANTAS TRANSGÊNICAS DE SOJA (*Glycine max*
L. Merrill) EXPRESSANDO BIP EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM
Pseudomonas syringae pv. *tomato***

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

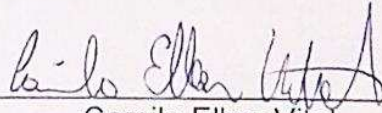
APROVADA: 24 de julho de 2017.



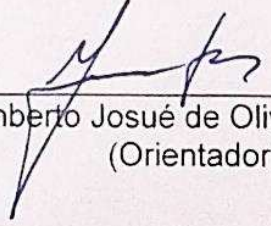
Juliana Rocha Lopes Soares Ramos



Leandro Luiz Borges



Camilo Elber Vital
(Coorientador)



Humberto Josué de Oliveira Ramos
(Orientador)

*"O mais importante na vida é arriscar. O mais complicado é ter medo.
E a coisa mais inteligente do mundo é tentar ser uma pessoa com moral."*

Shimon Peres (1923-2016)

Prêmio Nobel da Paz

"Feliz de quem atravessa a vida inteira tendo mil razões para viver."

Dom Hélder Câmara (1909-1999)

Arcebispo

DEDICATÓRIA

*A Deus,
Aos meus pais Rita de Cássia e José,
À minha avó materna Conceição e irmãos,
Àqueles que estiveram ao meu lado ao longo de tudo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, Rei dos Reis, que tem me acompanhado nos bons e maus momentos com sua sombra protetora onde me abrigo, me amparando e me iluminando.

A meus pais, Rita de Cássia e José, pela educação e sabedoria que me deram e por me incentivarem a sempre ser uma pessoa boa. A meus irmãos, Juliana e Júlio, por sempre estarem do meu lado em minhas decisões.

A meus amigos, em especial à minhas madrinhas, por sempre estarem comigo me apoiando e rezando por mim.

Aos amigos da Engenharia Ambiental, CISAB-ZM, Judô Luve, Tutoria e JSC, pelo amável convívio, apoio e por contribuírem tanto para o meu crescimento.

À Universidade Federal de Viçosa, desde os servidores pelo gentil convívio até os professores pelo conhecimento de coisas e de vida que me deram.

Às agências de fomento CAPES (financiadora deste projeto), CNPq e FAPEMIG, pelo apoio à pesquisa e ao desenvolvimento da ciência brasileira.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao corpo docente pelo conhecimento transmitido, além da responsabilidade de passá-lo adiante, fundamentais para a minha história.

Ao Prof. Dr. Humberto pelos bons momentos vividos e por todo ensinamento, paciência e dedicação passados e que contribuíram não só para a composição desta dissertação, mas para a minha vida.

À Profa. Dra. Elizabeth Fontes por permitir o desenvolvimento deste trabalho e fornecer o apoio técnico imprescindível para a execução do mesmo.

Ao Camilo Elber Vital e Pedro Augusto Braga dos Reis pela orientação, por estarem sempre dispostos a me ajudar e a tirar dúvidas ao longo do projeto.

À Flaviane e Jenny pela paciência em me ajudar em meu amadorismo nesta empreitada e pela dedicação, e à Thercia, João Carlos, Danilo e Lucas por terem contribuído na execução de todo o trabalho de pesquisa.

Aos colegas do NUBIOMOL, do BIOAGRO e do LBMP/INCT-IPP pelo ambiente agradável para o trabalho que proporcionaram e pela convivência estimulante e divertida ao longo dos experimentos.

A todos que de alguma forma marcaram a minha vida.

BIOGRAFIA

Juliano Mendonça Rodrigues (Vieiras, Minas Gerais, 15 de janeiro de 1991), filho de José Jacinto Rodrigues e Rita de Cássia Mendonça Rodrigues. Formado no Ensino Médio na Escola Estadual Assis Brasil, Vieiras, Minas Gerais, em 2009. Em 2010, ingressou na Graduação em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, tendo concluído em julho de 2015. Em agosto de 2015, ingressou no Programa de Pós-Graduação da UFRV, em Mestrado em Bioquímica Aplicada, tendo concluído em julho de 2017.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. A soja e sua importância econômica	3
2.2. O papel da proteína de ligação BiP.....	4
2.3. Mecanismos de defesa vegetal contra micro-organismos patogênicos	8
2.4. Interação da soja com <i>Pseudomonas syringae</i>	14
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo geral.....	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. METODOLOGIA	18
4.1. Inoculação de <i>P. s. pv. tomato</i> em soja em casa de vegetação	18
4.1.1. Cultivo das variedades de soja.....	18
4.1.2. Preparo de <i>P. s. pv. tomato</i> para inoculação	18
4.1.3. Experimento em casa de vegetação	19
4.2. Metabolômica.....	21
4.2.1. Perfis metabólicos por GC-MS	21
4.2.2. Quantificação de fito-hormônios por UHPLC-MS QqQ	22
4.2.3. Quantificação de metabólitos secundários por UHPLC-MS QqQ.....	24
5. RESULTADOS	26
5.1. Sintomas apresentados por folhas de soja em resposta à inoculação.....	26
5.2. Metabólitos responsivos determinados por análises de variância (ANOVA).....	29
5.3. Análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA).....	34
5.4. Análise das variáveis importantes na projeção	39
5.4.1. Caracterização metabólica por análise do <i>vip score</i>	39
5.4.2. Caracterização metabólica por análise do <i>fold change</i>	45
5.5. Análise de fito-hormônios e metabólitos secundários por LC-MS.....	46
5.5.1. Análise de fito-hormônios	46

5.5.2. Análise de metabólitos secundários	48
6. DISCUSSÃO	51
6.1. Análise dos sintomas em folhas de soja	51
6.2. Perfil de agrupamento dos tratamentos	52
6.3. Metabolismo primário	53
6.4. Resposta fito-hormonal	57
6.5. Metabolismo secundário	60
7. CONCLUSÃO	63
8. REFERÊNCIAS.....	64
9. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	77

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** O papel de BiP na resposta ao estresse. BiP, ao modular a via de PCD mediada por NRPs, inibe a via UPR atenuando a PCD e a senescência por esta via, ao passo que estimula a via de sinalização mediada por SA a ativação da via de PCD em resposta ao estresse biótico. Setas tracejadas indicam o efeito na expressão dos genes, enquanto setas contínuas indicam que o gene é alvo *downstream* imediato. Abreviaturas: PCD: morte celular programada (*programmed cell death*); GmERD15: ativador transcricional que ativa os promotores e a expressão de genes NRPs quando induzido; NRP: proteínas ricas em asparagina (*N-rich protein*), envolvidas na sinalização de PCD induzida por seca; GmNAC81 e GmNAC30: fatores de transcrição envolvidos com a PCD mediada por VPE; VPE: enzimas do processamento do vacúolo (*vacuolar processing enzyme*), envolvidas na PCD pelo colapso do vacúolo; UPR: via de proteínas mal dobradas (*unfolded protein response*); SA: ácido salicílico..... 7
- Figura 2.** Resposta vegetal ao patógeno. Elicitores podem ser espécie-específicos, como moléculas codificadas por genes *Avr*, ou inespecíficos, como fragmentos da parede celular liberados durante o processo da infecção; elicitores exógenos são originários do patógeno; elicitores endógenos são originários da planta; Abreviaturas: HR: reação de hipersensibilidade; genes *Avr*: genes de avirulência do patógeno; gene R: gene de resistência da planta; proteínas-PR: proteínas relacionadas à patogênese (*pathogenesis-related proteins*)..... 10
- Figura 3.** Representação do experimento piloto de inoculação de soja com *P. s. pv. tomato*..... 19
- Figura 4.** Fotos das folhas de soja submetidas à inoculação com *P. s. pv. tomato*..... 28
- Figura 5.** Abundância relativa de alguns metabólitos significativos obtidos por CG-MS. Diagrama de caixa para valores normalizados de concentração relativa em amostras de soja em 36 hpi. A estatística foi realizada a partir do *Metaboanalyst*. Dados seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras maiúsculas correspondem aos genótipos e minúsculas aos tratamentos..... 30
- Figura 6.** Abundância relativa de alguns metabólitos significativos obtidos por CG-MS. Diagrama de caixa para valores normalizados de concentração relativa em amostras de soja em plantas CI. A estatística foi realizada a partir do

<i>Metaboanalyst</i> . Dados seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras maiúsculas correspondem aos genótipos e minúsculas aos tratamentos.....	33
Figura 7. Análise dos PLS-DA tridimensional em soja WT e C9 em condições com (CI) e sem infecção (SI) com <i>P. s. pv. tomato</i> , pelo <i>MetaboAnalyst</i> . (A) tempo zero; B) tempo 8 hpi; C) tempo 36 hpi.....	35
Figura 8. Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Análise dos PLS-DA bidimensional em plantas de soja inoculadas com <i>P. s. pv. tomato</i> , realizada pelo <i>MetaboAnalyst</i> . Genótipo WT. O símbolo _Rx indica o número de repetição do tratamento.....	37
Figura 9. Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Análise dos PLS-DA bidimensional em plantas de soja inoculadas com <i>P. s. pv. tomato</i> , realizada pelo <i>MetaboAnalyst</i> . Genótipo C9. O símbolo _Rx indica o número de repetição do tratamento.....	38
Figura 10. Análise das variáveis importantes na projeção (<i>vip</i>). Principais metabólitos responsáveis pela discriminação entre grupos de soja no tempo zero, identificados em ordem decrescente pelo <i>vip score</i> . As cores indicam, em gradiente, a maior (vermelho) ou menor (verde) concentração relativa do metabólito, enquanto o valor do <i>vip score</i> indica a importância da variável.....	41
Figura 11. Análise das variáveis importantes na projeção (<i>vip</i>). Principais metabólitos responsáveis pela discriminação entre grupos de soja em 8 hpi, identificados em ordem decrescente pelo <i>vip score</i> . As cores indicam, em gradiente, a maior (vermelho) ou menor (verde) concentração relativa do metabólito, enquanto o valor do <i>vip score</i> indica a importância da variável.....	42
Figura 12. Análise das variáveis importantes na projeção (<i>vip</i>). Principais metabólitos responsáveis pela discriminação entre grupos de soja em 36 hpi, identificados em ordem decrescente pelo <i>vip score</i> . As cores indicam, em gradiente, a maior (vermelho) ou menor (verde) concentração relativa do metabólito, enquanto o valor do <i>vip score</i> indica a importância da variável.....	43
Figura 13. Análise das variáveis importantes na projeção (<i>vip</i>). Principais metabólitos responsáveis pela discriminação entre grupos de soja em resposta à interação planta-bactéria, identificados em ordem decrescente pelo <i>vip score</i> . As cores indicam, em gradiente, a maior (vermelho) ou menor (verde) concentração relativa do metabólito, enquanto o valor do <i>vip score</i> indica a importância da variável.....	44
Figura 14. Quantificação de fito-hormônios (ng/g) em amostras de soja A) com e sem infecção em 36 hpi e B) resposta temporal à inoculação com <i>P. s. pv. tomato</i> . Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=4). Médias	

seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras maiúsculas correspondem aos genótipos e minúsculas aos tratamentos (com e sem infecção). ACC: ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico.....	47
Figura 15. Quantificação de metabólitos secundários (ng/g) em amostras de soja A) com e sem infecção em 36 hpi e B) resposta temporal à inoculação com <i>P. s. pv. tomato</i> . Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=4). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras maiúsculas correspondem aos genótipos e minúsculas aos tratamentos (com e sem infecção).....	49
Figura 16. Representação simplificada do papel do ABA (ácido abscísico), SA (ácido salicílico), JA (ácido jasmônico) e ET (etileno) na resistência a patógenos	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema do experimento de inoculação de soja com <i>P. s. pv. tomato</i>	20
Tabela 2. Massas monitoradas por MRM para detecção e quantificação de fito-hormônios. A zeatina aparece duas vezes porque possui dois tipos de ions produtos formados.....	23
Tabela 3. Massas monitoradas por MRM para detecção e quantificação de alguns metabólitos secundários.....	25
Tabela 4. Metabólitos significativos na ANOVA determinados em amostras de soja CI e SI em 36 hpi.....	29
Tabela 5. Metabólitos significativos na ANOVA determinados em amostras de soja CI em função do tempo.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: grau Celsius

%: porcentagem

$A_{600\text{ nm}}$: absorvância a 600 nm

ABA: ácido abscísico

ACC: ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico

AIA: ácido indolacético

AABA: α -aminobutirato

ANOVA: análise de variância (*analysis of variance*)

BCAA: aminoácidos de cadeia ramificada (*branched-chain amino acid*)

BiP: *Binding protein*

C9: sojas engenheiradas com o gene SoyBiPD

CI: com infecção

CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio

DHS: di-hidroesfingosina

EUA: Estados Unidos da América

Φ : fluxo

FAME: ésteres metílicos de ácidos graxos (*fatty acid methyl esters*)

FC: *fold change*

FDR: taxa de falsas descobertas (*false discovery rate*)

g : força gravitacional

g: grama

GalNAc: N-acetilgalactosamina

GABA: γ -aminobutirato

GAD: glutamato descarboxilase

GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Genes Avr: genes de avirulência

GmERD15: *Glycine max early responsive to dehydration 15*

h: horas

hpi: horas pós-inoculação (*hours postinoculation*)

HR: reação de hipersensibilidade (*hypersensitive response*)

HSP70: *70 kilodalton heat shock proteins*

JA: ácido jasmônico

kDa: quilodalton

LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

L: litro

MAMPs: padrões moleculares associados a micro-organismos (*microbe associated molecular patterns*).

min: minutos

mM: milimolar

mmHg: milímetros de mercúrio

mg: miligrama

μ g: micrograma

μ L: microlitro

μ m: micrômetro

MRM: monitoramento de reações múltiplas (*multiple reaction monitoring*)

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

ng: nanograma

NRPs: proteínas ricas em asparagina (*N-rich protein*)

PEP: fosfoenolpiruvato

PAMPs: padrões moleculares associados a agentes patogênicos (*pathogen associated molecular patterns*)

p/v: relação entre peso e volume

PCD: morte celular programada (*programmed cell death*)

PCR: reação em cadeia da polimerase

PLS-DA: análise de discriminantes dos mínimos quadrados parciais

Proteínas-PR: proteínas relacionadas à patogênese (*pathogenesis-related proteins*)

P. s. pv. tomato: Pseudomonas syringae patovar *tomato*

P. s. pv. glycinea: Pseudomonas syringae patovar *glycinea*

RE: retículo endoplasmático

ROS: espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)

rpm: rotações por minuto

RPCV: rizobactérias promotoras de crescimento vegetal

s: segundos

SA: ácido salicílico

SAR: resistência sistêmica adquirida (*acquired systemic resistance*)

SI: sem infecção

SIR: resistência sistêmica induzida (*induced systemic resistance*)

SPT: serina-palmitoil transferases

TMS: trimetilsilício

UHPLC-MS QqQ: cromatografia líquida de ultraperformance acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo

UPR: via de proteínas mal dobradas (*unfolded protein response*)

URSS: União das Repúblicas Socialistas Soviética

v/v: relação entre volume e volume

vip score: pontos das variáveis importantes na projeção

VPE: enzimas do processamento do vacúolo (*vacuolar processing enzyme*)

WT: soja convencional *Glycine max.* cultivar Conquista

RESUMO

RODRIGUES, Juliano Mendonça, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Metabolômica de plantas transgênicas de soja (*Glycine max* L. Merrill) expressando BiP em resposta a inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato***. Orientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos. Coorientadores: Elizabeth Pacheco Batista Fontes, Camilo Elber Vital e Pedro Augusto Braga dos Reis.

O Brasil é o segundo produtor mundial de soja. Porém, estresses bióticos e abióticos tem limitado a expansão da produtividade. Nosso grupo de pesquisa do LBMP, BIOAGRO-UFV, tem observado que plantas transgênicas superexpressando BiP (*Binding protein*), chaperona com atividade associada à via UPR (*unfolded protein response*) e à modulação de eventos de PCD (*programmed cell death*), são mais tolerantes à seca pela manutenção da homeostase celular e retardo do acionamento da PCD. Dos fitopatógenos, a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* provoca reação de hipersensibilidade na soja, uma vez que a interação planta-bactéria é incompatível. Neste trabalho, foi caracterizado o perfil metabólico dos genótipos transgênico superexpressando BiP (C9) e selvagem (WT) por GC-MS. Foram também avaliados por LC-MS, a abundância de fito-hormônios e alguns metabólitos secundários alvos em resposta à interação de soja com *P. s.* pv. *tomato* para determinar alterações metabólicas nestes genótipos relacionadas com o fenótipo de morte celular e reações de hipersensibilidade. O acúmulo de aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos pode estar relacionado ao controle de danos ocasionado pelo estresse biótico, sendo menor em C9 devido à capacidade de BiP em manter a homeostase celular. Compostos como di-hidroesfingosina (DHS) e gama-aminobutirato (GABA) podem estar envolvidos com mecanismos de PCD em células visando restringir a colonização do tecido foliar por bactérias. Além disso, observou-se uma tendência para o aumento de ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (JA), embora os níveis de ácido abscísico (ABA) em C9 tenham sido menores, indicando o papel antagonista do ABA na via de sinalização mediada por SA/JA e síntese de fitoalexinas ao longo da infecção bacteriana. A considerável importância do SA e JA, que disparam vias de sinalização de controle microbiano, em C9 possivelmente está no controle negativo da PCD por BiP, que impede a contenção do

patógeno por esta via. As concentrações de metabólitos secundários, por sua vez, sofreram o maior incremento ao longo do tempo, sobretudo daidzeína e genisteína, sendo maior em C9. Este acréscimo pode estar associado com as propriedades antimicrobianas das isoflavonas. Por isso, em plantas C9, a superexpressão de BiP atrasa a via de PCD, impedindo a contenção da colonização bacteriana em tempo hábil, sendo a ação antimicrobiana o mecanismo de resposta predominante em C9, ao passo que em WT predomina a via de PCD.

ABSTRACT

RODRIGUES, Juliano Mendonça, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Metabolomic analysis of transgenic soybean leaves (*Glycine max* L. Merrill) expressing BiP in response to inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. tomato.** Adviser: Humberto Josué de Oliveira Ramos. Co-advisers: Elizabeth Pacheco Batista Fontes, Camilo Elber Vital and Pedro Augusto Braga dos Reis.

Brazil is the world's second largest soybean's producer. However, biotic and abiotic stresses have limited productivity expansion. Our research group at the LBMP, BIOAGRO-UFV, has observed that transgenic plants overexpressing BiP (Binding protein), chaperone with activity associated with pathway UPR (unfolded protein response) and modulation of PCD (programmed cell death) events, are more tolerant to drought by the maintenance of cellular homeostasis and retarding the activation of PCD. Plant pathogens, *Pseudomonas syringae* pv. tomato provokes hypersensitivity reaction in soybean, since it is an incompatible interaction. In this work, the metabolic profile of the transgenic genotypes overexpressing BiP (C9) and wild type (WT) by GC-MS. We also evaluated by LC-MS, the abundance of phytohormones and some target secondary metabolites in response to the interaction of soybean with *P. s.* pv. tomato to determine metabolic changes in these genotypes related to cell death phenotype and hypersensitivity reactions. The accumulation of amino acids, sugars and organic acids may be related to damage control caused by biotic stress, being lower in C9 due to BiP's ability to maintain cellular homeostasis. Compounds such as dihydrosphingosine (DHS) and gamma aminobutyric acid (GABA) may be involved with PCD mechanisms in cells with the aim of to restrain the colonization of foliar tissue by bacteria. Furthermore, there was a tendency for increased salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA), although abscisic acid (ABA) levels have been lower in C9 plants, indicating the ABA antagonist role in the SA-mediated or JA-mediated signaling pathway and phytoalexin synthesis throughout the bacterial infection. The considerable importance of SA and JA, which trigger pathways of microbial control signaling, in C9 is possibly in the negative PCD control by BiP, which prevents the containment of the pathogen for this pathway. Concentrations of secondary

metabolites suffered the greatest increase over time, especially daidzein and genistein, being higher in C9 plants. This increase may be associated with the antimicrobial properties of isoflavones. Therefore, in C9 plants, the overexpression of BiP delays the PCD pathway, preventing bacterial colonization in a timely manner, and the antimicrobial action is the predominant response mechanism in C9, whereas in WT, the PCD pathway predominates.

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) se tornou uma das culturas mais prósperas no Brasil, com significativo aumento de produção ao longo das últimas quatro décadas e tornando o Brasil o segundo produtor mundial (EMBRAPA, 2017). Entretanto, a soja é susceptível a fatores abióticos como a seca e também a várias doenças provocadas por patógenos, causando danos na produção e qualidade dos grãos.

Com o intuito de superar estas barreiras, estratégias de biologia molecular, como a manipulação de genes e de sua expressão, vem ganhando espaço nos últimos tempos. Estudos tem permitido manipular a expressão de genes cujos produtos agem diretamente na oxidação e/ou degradação de produtos formados em condições estressantes, como antioxidantes, e em vias de reparo de estruturas proteicas, como as chaperonas moleculares desenvolvendo características de resistência e tolerância às condições adversas em plantas como soja, dentre outras.

Das chaperonas moleculares, BiP (*Binding protein*) se destaca por sua ampla atividade tanto em eventos abióticos quanto bióticos. Sua participação está associada à via de proteínas mal dobradas (UPR, *unfolded protein response*) e à modulação de eventos de morte celular (PCD, *programmed cell death* – morte celular programada). Estudos comprovam que a superexpressão de BiP confere tolerância à seca em soja (ALVIM *et al.*, 2001; VALENTE *et al.*, 2009). Porém, pesquisas demonstram que tal benefício implica em uma perda da qualidade do enovelamento correto de proteínas no retículo endoplasmático, organela principal na biossíntese e no transporte de proteínas (ALVIM *et al.*, 2001; LEBORGNE-CASTEL *et al.*, 1999; VALENTE *et al.*, 2009; MORENO *et al.*, 2012), como proteínas ligadas às atividades antimicrobianas.

Sabe-se que a maioria das interações planta-bactéria não implica em doença, uma vez que o vegetal é um microecossistema onde habitam inúmeras bactérias de maneira comensal e/ou simbiótica (STURZ, 2000). Entretanto, a entrada de bactérias no interior do vegetal através de feridas ou por estômatos abertos podem provocar reações diversas desencadeadas pela liberação de

substâncias antimicrobianas e alterações estruturais e bioquímicas nas células da planta. Dependendo do tipo de patógeno reconhecido, se pode ter resistência sistêmica adquirida (SAR) ou induzida (SIR), assinalada pela aquisição de resistência ao longo de diversas partes do vegetal ou reação de hipersensibilidade (HR), caracterizada pela colonização de uma bactéria incompatível e por uma manifestação restrita ao local de infecção (PIETERSE *et al.*, 1996; VAN WESS *et al.*, 1997; ZOU *et al.*, 2005).

Uma das doenças na soja provocada por bactéria é o crestamento bacteriano, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. As consequências desta doença, apesar de não provocarem a morte do vegetal, reduzem sua produtividade, acarretando prejuízos a uma cultura em expansão no país. Devido à sua incompatibilidade, um patovar da *P. syringae*, *P. s.* pv. *tomato*, que provoca doença no tomateiro, ativa os mecanismos de defesa vegetal, produzindo reação hipersensitiva ao infectar plantas de soja (GARDAN, 1999; PRESTON, 2000; ZOU *et al.*, 2005; BENNETT *et al.*, 2014).

Com isso, o presente trabalho possui como objetivo principal a obtenção de perfis de metabolômica de modo a avaliar também as redes de sinalização e resposta à infecção por bactéria não compatível *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em plantas transgênicas de soja tolerantes a seca, visando desta forma uma caracterização das cascatas de resposta ao estresse biótico em função da transgenia. Tais estudos poderão ser importantes para a obtenção de tolerância engenheirada às condições de estresse biótico e abiótico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A soja e sua importância econômica

Uma das culturas mais promissoras nos cenários nacional e mundial, as primeiras referências acerca da soja (*Glycine max* L. Merrill) apareceram por volta de 2800 a.C. na China, onde as plantas foram descritas no livro *Pen Ts'ao Kong Mu*, sendo considerada um grão sagrado, assim como o arroz e o trigo (EMBRAPA, 2016). Trazida ao Ocidente no período das Grandes Navegações (século XVI), a indústria mundial começou a se interessar pelo grão no início do século XX pelo elevado teor de proteína e óleo. As tentativas de introdução comercial do cultivo na Europa, devido ao clima desfavorável, foram mal sucedidas (EMBRAPA, 2016).

No Brasil a soja está presente desde o fim do século XIX, contudo, sua expansão se deu somente no começo dos anos 1970, com a demanda por farelo de soja para a produção de suínos e aves (EMBRAPA, 2016). O governo federal passou a fazer intensa campanha de consumo e cultivo (GRANDE ENCICLOPÉDIA LAROUSSE CULTURAL, 1998). Isto, junto com a insuficiência de produção dos EUA e eventos que quebraram a safra na URSS, fez o país suplantarem a China como segundo produtor mundial de soja (MISSÃO, 2006). A partir de então, o país passou a investir em tecnologias para adaptação ao clima brasileiro, produzindo variedades adaptadas a baixas latitudes (EMBRAPA, 2016).

O Brasil é atualmente o segundo maior produtor mundial de soja, ficando atrás dos EUA, sendo que, durante a safra de 2016/2017, a produção de soja foi 113,9 milhões de toneladas (32% da produção mundial) em 33,9 milhões de hectares de área plantada (28% da área cultivada mundial), envolvendo US\$ 25,4 bilhões (EMBRAPA, 2017). Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul são os maiores estados produtores (EMBRAPA, 2017). Apesar da crise político-econômica de 2014-2017, o país registrou um aumento na produção no primeiro semestre de 2017, colhendo 13% de soja a mais que no ano passado (KOVALIC & CAPELLE, 2017).

O crescente interesse pela soja no século XXI se deve ao seu alto valor nutricional decorrente do elevado teor de óleo de suas sementes (rico em ácidos graxos poli-insaturados) e rica fonte de proteínas (mais de 40%) e o seu uso na indústria, desde a fabricação de detergentes e xampus a biocombustíveis, além do surgimento de técnicas que permitiram ampliar significativamente a área e a produtividade (GRANDE ENCICLOPÉDIA LAROUSSE CULTURAL, 1998; MISSÃO, 2006), como o uso de plantas modificadas geneticamente. Importante salientar que a pesquisa com transgênicos é regulamentada pela Lei nº 11.105, de 2005 (BRASIL, 2005).

A soja é uma herbácea pertencente à mesma família do grão-de-bico, ervilha, fava e feijão. Sistemáticamente, a soja pertence ao domínio Eukarya, reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae, gênero *Glycine*, espécie *G. max* L. Merrill. Trata-se de uma planta com grande variedade de cultivares, que se diferenciam tanto no ciclo vegetativo (da emergência da plântula ao aparecimento das primeiras flores), quanto no reprodutivo (do início da floração ao fim do ciclo de vida) e na produtividade, sendo uma planta altamente influenciada por fatores do meio ambiente (EMBRAPA, 2016).

2.2. O papel da proteína de ligação BiP

Nos últimos anos, prejuízos na produção de soja foram reportados em regiões do Brasil que passaram por períodos de seca e estresses bióticos (CONAB, 2016). Os estresses abióticos são considerados um dos principais fatores de restrição à agricultura brasileira, considerando os efeitos adversos no crescimento e desenvolvimento das plantas, contribuindo para a redução da produtividade agrícola. Estes estresses, particularmente os relacionados com extremos de temperatura, salinidade e seca causam impactos, não somente nas culturas agrônômicas em áreas tradicionalmente usadas para agricultura, como também representam barreiras à introdução de culturas em áreas com potencial para a expansão da produção agrícola (CRAMER *et al.*, 2011).

Dentre estes, o estresse hídrico é o maior fator limitante do crescimento e desenvolvimento vegetal. Ocorre quando há contínua perda de água por evaporação e/ou transpiração devido às baixas condições de umidade atmosférica e disponibilidade reduzida de água no solo (JALEEL *et al.*, 2007). Plantas mostram diferenças na sensibilidade a estresse por seca em diferentes estádios de desenvolvimento. Dados sobre produção esperada de soja e produção real obtida reportam perdas entre 20 e 25% com seca (HIRAKURI, 2009). Os mecanismos complexos de respostas morfofisiológicas e moleculares das plantas de tolerância ao estresse provocado pela seca explicam o progresso lento no aumento da produtividade em ambientes predispostos a este estresse (TUBEROSA & SALVI, 2006). Estudos procuram desenvolver plantas capazes de manter e aumentar a produtividade sob condições limitantes de água, uma vez que as perspectivas de problemas no Brasil com a seca e a falta de água no futuro são significativamente preocupantes (CATTIVELLI *et al.*, 2008).

O retículo endoplasmático (RE), compartimento da via de secreção e transporte celular dos eucariontes, se estende pelo citosol e tem como principal função a síntese e modificação de proteína, além da biossíntese de lipídeos e regulação da homeostase de cálcio (VOELTZ *et al.*, 2002; YANJUN & HENDERSHOT, 2004). Logo após a entrada no RE, as proteínas emergentes são alvos de dobramento e modificações pós-traducionais, como fosforilação, glicosilação, metilação e clivagem (YANJUN & HENDERSHOT, 2004). Em plantas o RE difere em morfologia daquele observado nos animais, sendo contínuo ao longo do vegetal e interconectado através de cadeias que atravessam os plasmodesmas. Isso facilita a comunicação intercelular de importantes sinais de estresse, como injúria física, infecções por bactérias, fungos, nematoides e vírus, acarretando indução sistemática de genes específicos (GHOSHROY, 1997; JELITTO-VAN DOOREN, 1999). Uma das proteínas que atua no RE no dobramento correto de outras proteínas são as chaperonas.

As chaperonas são proteínas que promovem o correto dobramento de proteínas *in vivo*, sendo empregadas no enovelamento, oligomerização e remoção para proteólise e sendo induzidas por estresses fisiológicos

(HAMMOND & HELENIUS, 1995). Das chaperonas do RE, BiP (*binding protein*), ou GRP78, é uma proteína multifuncional de 78 kDa da família HSP70 que participa na regulação de diversos processos celulares (PILLON & SCHEKMAN, 1999). Além de sua atividade natural de chaperona, BiP possui função como sensor da via de sinalização UPR, acionada em resposta a estresses no RE (FIGUEIREDO *et al.*, 1997; CASCARDO *et al.*, 2001). Segundo Urade (2007), nas proteínas que não adquirem uma conformação adequada ou formam agregados proteicos, BiP desencadeia a via de sinalização para remoção por meio de degradação no proteassomo ou ativa uma via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR), que tem como função principal elevar a capacidade de enovelamento do RE. As plantas podem empregar esta maquinaria de reconhecimento para estimular respostas breves em condições de estresses (FIGUEIREDO *et al.*, 1997; CASCARDO *et al.*, 2001; PICOLI *et al.*, 2001; FIETTO *et al.*, 2007).

Em plantas, estudos indicam que BiP tem sua expressão aumentada em condições de estresse, tanto bióticos quanto abióticos, sendo demonstrado que a sua superexpressão aumenta a tolerância a estresses, além de conferir tolerância à seca quando expressa ectopicamente em soja (ALVIM *et al.*, 2001; VALENTE *et al.*, 2009). Isso evidencia o papel de BiP nas vias de sinalização e sua atuação na manutenção da homeostase celular (LEBORGNE-CASTEL *et al.*, 1999), conforme a Figura 1.

A chaperona molecular BiP age em respostas a estresses no RE e osmótico, como demonstram inúmeros estudos (URADE 2007; LEBORGNE-CASTEL *et al.*, 1999; VALENTE *et al.*, 2009), confirmando uma possível conexão entre estes. A hipótese de que as vias UPR e de sinalização a estresse osmótico convirjam resultando em respostas integradas dependentes de BiP e de defesa se fundamentou em estudos sobre o potencial de BiP como modulador da via UPR (BERTOLOTTI *et al.*, 2000) e sobre sua competência em manter o turgor foliar em plantas transgênicas submetidas a condições de déficit hídrico (ALVIM *et al.*, 2001; VALENTE *et al.*, 2009). Estudos identificaram transcritos de soja induzidos por ativação da via UPR (estresses do RE) e por estresse osmótico, garantindo um conjunto de genes especificamente induzidos por estresse osmótico, entre eles diversos

candidatos com o potencial para conferirem tolerância à seca (RODRIGUES *et al.*, 2006).

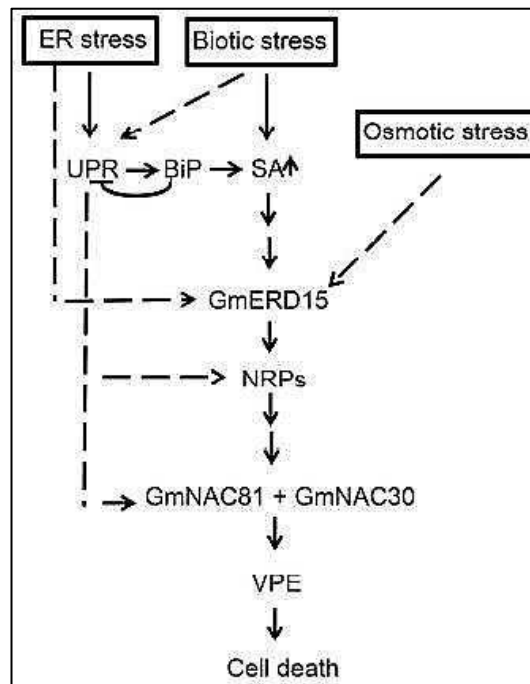


Figura 1. O papel de BiP na resposta ao estresse. BiP, ao modular a via de PCD mediada por NRPs, inibe a via UPR atenuando a PCD e a senescência por esta via, ao passo que estimula a via de sinalização mediada por SA a ativação da via de PCD em resposta ao estresse biótico. Setas tracejadas indicam o efeito na expressão dos genes, enquanto setas contínuas indicam que o gene é alvo *downstream* imediato. Abreviaturas: PCD: morte celular programada (*programmed cell death*); GmERD15: ativador transcricional que ativa os promotores e a expressão de genes NRPs quando induzido; NRP: proteínas ricas em asparagina (*N-rich protein*), envolvidas na sinalização de PCD induzida por seca; GmNAC81 e GmNAC30: fatores de transcrição envolvidos com a PCD mediada por VPE; VPE: enzimas do processamento do vacúolo (*vacuolar processing enzyme*), envolvidas na PCD pelo colapso do vacúolo; UPR: via de proteínas mal dobradas (*unfolded protein response*); SA: ácido salicílico (Fonte: CARVALHO *et al.*, 2014).

De acordo com Kimata e colaboradores (2003), a UPR ativa a expressão de diversos genes-alvo, visando à manutenção da homeostase celular. Sob condições não estressantes, os transdutores de estresse do RE ATF6, IRE1 e PERK são conservados em estado inativo por meio de interações com BiP, enquanto que sob condições de estresse no RE, ocorre a liberação de BiP dos sensores, que assim se tornam ativos, iniciando a via UPR (LEE, 2005). Então,

há a ativação da expressão dos genes alvo com a finalidade de ampliar a capacidade do RE em processar proteínas em condições estressantes, como chaperonas e fatores de tráfego de membrana. (MA & HENDERSHOT, 2001; PATIL *et al.*, 2001; KAUFMAN *et al.*, 2002; KIMATA *et al.*, 2003).

2.3. Mecanismos de defesa vegetal contra micro-organismos patogênicos

De acordo com Sturz (2000), se podem encontrar várias espécies de bactérias explorando diferentes regiões do vegetal, sendo que as bactérias associadas às plantas podem ser divididas, didaticamente, em endofíticas (habitam o interior da planta hospedeira sem causar dano aparente ao hospedeiro), epifíticas (crescem e vivem sobre a superfície vegetal) e fitopatogênicas (causam dano aparente ao hospedeiro). Para Sobral (2003), não há um limite claro e sim um gradiente entre estes níveis de interação em um habitat dinâmico, havendo bactérias que flutuam entre as formas de colonização, de acordo com uma série de fatores, como condições ambientais, interações com outros micro-organismos associados às plantas ou ainda características da planta hospedeira.

Dentre as diversas formas de infecção de patógenos em plantas, destaca-se o acesso pelos estômatos. Estes possuem a função de controlar os níveis de evapotranspiração dos vegetais por meio da abertura e fechamento de células-guardas, movimento controlado por diversos fatores como umidade, fotoperíodo e alteração dos níveis de ácido abscísico (ABA) entre outros (HETHERINGTON & WOODWARD, 2003; MURATA *et al.*, 2015).

O conhecimento sobre indução de resistência contra patógenos em plantas remonta ao início do século XX a partir de trabalhos com a interação *Begonia* sp. - *Botrytis cinerea* (KESSMAN *et al.*, 1994). Chester (1933) estudou a obtenção de resistência por plantas após infecção por patógenos o levando a definir o conceito de reação de hipersensibilidade (HR, do inglês *hypersensitive response*). Ross (1961) examinou a aquisição de resistência a vários patógenos em tabaco, resultando na concepção do termo resistência sistêmica adquirida (SAR, do inglês *acquired systemic resistance*). Foram realizados

estudos com interação cafeeiro - *Hemileia vastatrix* e rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV) em *Arabidopsis*, levando ao conceito de resistência sistêmica induzida (SIR, do inglês *induced systemic resistance*) (PIETERSE *et al.*, 1996; GUZZO, 2004).

A indução de resistência a um determinado patógeno pode ser definida como a capacidade do vegetal em impedir ou retardar a entrada ou subsequente atividade do patógeno em seus tecidos. Agentes que sensibilizam a planta ativam mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos, envolvendo uma complexa rede de sinalização celular, como a abertura de canais iônicos, modificações nos níveis de fosforilação de proteínas e ativação transcricional de genes relacionados a defesa e de enzimas promotoras de modificações no metabolismo (CORDEIRO & SÁ, 1999). Os processos que desencadeiam a indução das respostas de defesa podem ser sintetizados em três fases: reconhecimento, sinalização e ativação (CORDEIRO & SÁ, 1999; VAN LOON & VAN STRIEN, 1999), enquanto, em seu trabalho, Zou e colaboradores (2005) as denominam de indutora, efetora e degradadora. Para fins didáticos, foram denominadas fase I, fase II e fase III, respectivamente. O intervalo de manifestação das fases é de zero a 2 horas pós-inoculação (hpi, do inglês *hours postinoculation*) para a fase I, 3 hpi a 10 hpi ou mais para a fase II e após 24 hpi para a fase III, sendo que esta última ocorre apenas se os eventos de defesa das fases I e II falharem, levando à HR.

Na fase I, o reconhecimento de agentes fitopatogênicos ocorre pela ligação de um elicitor (molécula capaz de induzir alguma resposta de defesa, como proteínas ou carboidratos oriundos de fungos, bactérias e vírus, ou ainda injúrias produzidas por insetos e eventos abióticos) a um receptor (molécula proteica localizada na célula vegetal que reconhece o elicitor) e o reconhecimento do patógeno por um produto de um gene de resistência da planta. A interação “gene a gene”, na qual existe um gene que confere resistência ao vegetal para cada gene que confere virulência ao patógeno (FLOR, 1956), é essencial para a indução de mecanismos de resistência em plantas (CORDEIRO & SÁ, 1999), conforme Figura 2.

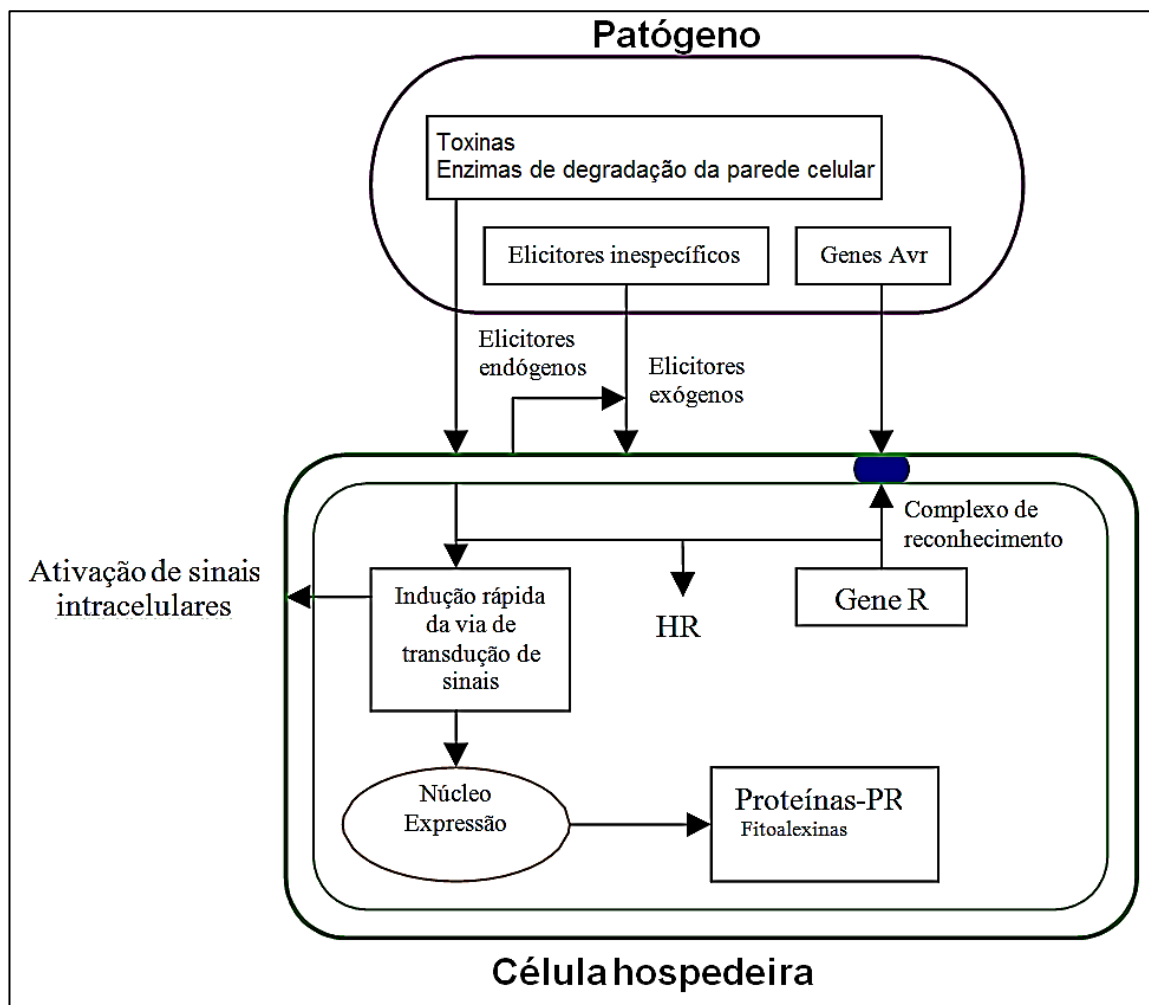


Figura 2. Resposta vegetal ao patógeno. Elicitores podem ser espécie-específicos, como moléculas codificadas por genes *Avr*, ou inespecíficos, como fragmentos da parede celular liberados durante o processo da infecção; elicitores exógenos são originários do patógeno; elicitores endógenos são originários da planta; Abreviaturas: HR: reação de hipersensibilidade; genes *Avr*: genes de avirulência do patógeno; gene R: gene de resistência da planta; proteínas-PR: proteínas relacionadas à patogênese (*pathogenesis-related proteins*) (Fonte: SLATER *et al.*, 2003).

Após o reconhecimento, a planta começa a liberar substâncias que podem ser consideradas sinalizadoras (fase II). Para Cardoso Filho (2003), uma substância é sinalizadora se for sintetizada pelo vegetal, for móvel pelo sistema de vasos condutores, aumente expressivamente depois do ataque do patógeno e promova a síntese de substâncias de defesa.

Nas rotas de sinalização celular, os fito-hormônios possuem papel crucial na ativação e otimização de respostas defensivas, se destacando o ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e derivados

(jasmonatos) e etileno, dentre outros (ECKER, 1995; DURNER *et al.*, 1997; JWA *et al.*, 2001).

O ABA parece estar relacionado como fator constitutivo da resposta das plantas para se adaptar a condições de estresse uma vez que Daie e Campbell (1981), em seus estudos, mostram o acúmulo em folhas onde age no fechamento estomático, independente do estresse atuante.

O SA está envolvido na defesa das plantas contra o ataque de micro-organismos como fungos, bactérias e vírus, pois desencadeia a produção de proteínas-PR (proteínas relacionadas à patogênese, do inglês *pathogenesis-related proteins*), protetoras contra ataques de patógenos. Estudos com *Arabidopsis* demonstraram que o acúmulo de SA age de maneira efetiva na expressão de mecanismos de resistência (DELANEY *et al.*, 1994), além de sua atuação na regulação da atividade de desintoxicação celular, por meio de enzimas envolvidas na degradação de ROS (espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*), como peroxidases e superóxido dismutases (AZOOZ & YOUSSEF, 2010).

O JA e seus derivados estão largamente distribuídos nos tecidos, estando envolvidos em vários processos morfofisiológicos, como abertura de estômatos, alongamento de raízes e senescência, entre outros. A ação de defesa dos jasmonatos está vinculada a defesa contra fitopatógenos e insetos e a indução da senescência, de acordo com Koda (1992) e Athayde Sobrinho e colaboradores (2005).

O etileno (CH₂=CH₂), fito-hormônio volátil com funções fisiológicas diversas, é sintetizado por plantas em processos de desenvolvimento, estresse do ambiente e após a exposição a elicitores de mecanismos de defesa, em resposta a eventos como seca, ferimento e defesa contra patógenos. O modo como o etileno atua na sinalização de respostas de defesa contra patógenos ainda não é bem claro (ECKER, 1995).

Durante muito tempo, os hormônios foram considerados como compostos funcionais de ação distinta. O conceito de comunicação cruzada (*crosstalk*), proposto por Alonso e Ecker (2007), afirma que há um

compartilhamento de componentes sinalizadores em diferentes vias de sinalização havendo uma complexa rede de respostas interligadas. Hoje, o entendimento dos níveis de resposta hormonal possui importância crucial na elucidação do comportamento, crescimento e produção vegetal (KOORNNEEF & PIETERSE, 2008).

Etapa seguinte à sinalização, a manifestação de respostas de defesa possui como objetivo a suspensão, ou ao menos o atraso, do processo de entrada do micro-organismo no interior da planta, além de criar condições adversas à propagação do mesmo nos tecidos vegetais (fase III). Tais barreiras podem proteger por meio de mecanismos estruturais ou bioquímicos e estas barreiras podem ser, no que diz respeito ao período de formação, subdivididas em pré e pós-formadas, ou seja, se formam antes ou são ativadas após a entrada do patógeno. (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Dentre estas, se destacam as barreiras bioquímicas pós-formadas.

As barreiras bioquímicas pós-formadas são produzidas a partir da presença do micro-organismo ou de seus produtos, induzidas pela interação de inibidores presentes na superfície do invasor com receptores localizados na célula vegetal por meio de fenômenos de reconhecimento. Plantas podem desenvolver resistência a um micro-organismo ao reconhecer padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPs, do inglês *pathogen associated molecular patterns*) e desencadear a resposta de defesa. Uma combinação de genes que traduzem proteínas efetoras do patógeno e genes de resistência da planta é decisiva para determinar quais espécies um grupo específico de bactérias pode infectar. Como os PAMPs são funcionalmente necessários ao micro-organismo, não podem estar ausentes; entretanto, patógenos podem encontrar modos de suprimir a resposta imune vegetal, levando a uma corrida evolutiva entre patógeno e hospedeiro (BALTRUS *et al.*, 2012; ICHINOSE *et al.*, 2013).

A interação planta-patógeno geralmente é dividida em dois tipos. Na interação compatível, no caso de patógenos virulentos (ausência do gene *avr*) ou plantas sem gene de resistência, o vegetal sofre a invasão do patógeno que se multiplica, coloniza o tecido e provoca a doença. Na interação incompatível, no caso da conjunção de patógenos avirulentos (presença do gene *avr*) e

plantas com gene de resistência, defesas vegetais impedem a multiplicação do patógeno quando este adentra nas células do tecido (CORDEIRO & SÁ, 1999).

Ocorre reação de hipersensibilidade quando um micro-organismo não patogênico ou fitopatogênico incompatível infecta o tecido vegetal, alterando o metabolismo nas células ao redor do sítio de invasão e provocando indução de resistência. A HR é caracterizada pela limitação do crescimento bacteriano no sítio de infecção a partir de mudanças na célula hospedeira, como o aumento da taxa de respiração, alteração na permeabilidade celular e síntese de compostos. Estes podem ser, dentre outras, fitoalexinas e espécies reativas de oxigênio (ROS). Fitoalexinas são compostos secundários de composição química heterogênea e com propriedades antimicrobianas, como os flavonoides. ROS são compostos derivados do oxigênio livre (O_2) que contém um elétron livre desemparelhado, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radicais hidroxílicos (OH^{\cdot} e derivados), apresentando citotoxicidade e sendo responsáveis pela defesa por estresse oxidativo. Este conjunto de fatores promove a formação de pequenos círculos necróticos de cor castanha ao redor do sítio de invasão e o confinamento do micro-organismo (FINKEL, 2000; AGRIOS, 2004; ZOU *et al.*, 2005).

A resistência sistêmica adquirida (SAR) é um fenômeno que ocorre quando um sinal é liberado a partir do sítio de infecção, provocando necrose foliar no sítio infectado ou acúmulo de proteínas-PR e fitoalexinas, além da translocação do sinal a diversas partes do vegetal, induzindo reações de defesa e o protegendo de subseqüentes ataques. Sua indução é dependente de SA, comumente induzida por agentes patogênicos ou ativadores químicos, e imunizando o vegetal a um amplo espectro de patógenos (VAN LOON *et al.*, 1999). Estudos indicam sua presença em culturas como soja e outras fabáceas (STICHER *et al.*, 1997).

Assim como a SAR, a resistência sistêmica induzida (SIR) também induz à proteção sistêmica e apresenta um amplo espectro de atuação (efetividade contra diferentes patógenos). Estudos com RPCV demonstraram que, ao serem aplicadas no solo, permaneceram localizadas na superfície radicular, mas induziram resistência em caules e folhas. Porém, diferentemente da SAR, a indução da SIR segue uma rota de sinalização não dependente do SA,

associada ao etileno e jasmonatos (VAN WESS *et al.*, 1997; PIETERSE *et al.*, 1998; VAN LOON *et al.*, 1998).

O PCD (*programmed cell death* – morte celular programada) é um processo associado ao envio de sinais celulares que comandam a destruição de células com o prejuízo mínimo às células vicinais (PALLAVAN-UNSAI *et al.*, 2005). Em plantas, ocorre ao longo dos processos de desenvolvimento (embriogênese, senescência foliar e desenvolvimento do tecido vascular) e no processo de interação planta-patógeno. (O'BRIEN *et al.*, 1998). Sabe-se, entretanto, que a função protetora de BiP está relacionada a sua capacidade de modular eventos de morte celular induzidos por estresses (REIS *et al.*, 2012). Como locus para a síntese e enovelamento de proteínas e outros compostos, inclusive antimicrobianos, o RE precisa estar em equilíbrio, e a perturbação em sua homeostasia leva ao acúmulo de proteínas mal dobradas, induzindo a UPR e precipitar os processos de PCD (CARVALHO *et al.*, 2014).

2.4. Interação da soja com *Pseudomonas syringae*

Os micro-organismos são um dos principais agentes capazes de causar danos nas plantas, sendo responsáveis por importantes perdas e diminuição da qualidade das culturas em todo o mundo. Dentre estes, encontra-se o grupo *Pseudomonas syringae*. O gênero *Pseudomonas* (do grego *pseudes*, falso + *monos*, único) são um grupo heterogêneo de bactérias, pertencentes ao filo Proteobacteria e à classe Gamma Proteobacteria. São bactérias gram-negativas, bacilares, detentoras de flagelos polares, aeróbias e ubíquas (GRANDE ENCICLOPÉDIA LAROUSSE CULTURAL, 1998; PRESTON, 2000). O nome *syringae* advém do lilás (*Syringa vulgaris* L.), planta onde foi inicialmente descoberto o grupo, a partir da sua colonização por *P. syringae* pv. *syringae*, um patovar do grupo *P. syringae*. Patovares são estirpes de bactérias similares cuja caracterização se dá pela patogenicidade e especificidade de hospedeiros e são denominados com um terceiro nome adicionado ao nome científico. Por exemplo, *P. s.* pv. *glycinea* coloniza a soja, enquanto *P. s.* pv. *pisi* ataca a ervilha (*Pisum sativum* L.; YOUNG *et al.*, 1996; GARDAN, 1999).

Dos problemas fitossanitários da soja, se destaca como um dos principais o crestamento bacteriano, provocado por *P. s. pv. glycinea*, comumente atingindo a parte aérea da planta. Nas folhas, revela-se pelo surgimento de pequenas áreas de tecido necrosado restritas às nervuras, adquirindo forma angular típica e coloração pardacenta e podendo haver coalescência de manchas, produzindo extensas regiões de necroses no limbo foliar. Quando atingem os frutos (vagens), as lesões começam com pequenas áreas de tecido necrosado cor castanha, podendo se alojar no exterior das sementes, com a difusão para o solo durante a germinação. Já foi determinado que *P. s. pv. glycinea*, em condições ambientais favoráveis, podem desenvolver sintomas em cultivares de soja e iniciar epidemias no campo, reduzindo a qualidade do grão produzido (BENNETT *et al.*, 2014). Sendo assim, a necessidade de um controle eficaz de fitobactérias tem sido amplamente estudada.

Na classificação dos grupos de *Pseudomonas*, usavam-se testes tradicionalmente baseados na morfologia, fisiologia, bioquímica, enzimologia e simbiose (VINCENT, 1970). Nos últimos anos, porém, técnicas de biologia molecular baseadas em hibridização DNA-DNA e comparação de sequências conservadas de 16S rRNA, apesar do custo, estão elucidando a filogenia bacteriana e propondo a inclusão de vários patovares de *P. syringae* em novas espécies de *Pseudomonas* – a título de exemplo, a espécie *P. tomato* foi sugerida (GARDAN, 1999). Entretanto, muitas estirpes propostas como novas espécies ou incorporadas a esta continuam sendo referidas como patovares de *P. syringae* – neste caso, *P. s. pv. tomato* (GARDAN, 1999; PRESTON, 2000).

O patovar *P. s. pv. tomato* é responsável, no tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), por perdas na produção ao provocar pontos de necrose cor castanha circundados por um halo amarelado em folhas e ocasionalmente sulcos pretos na superfície dos frutos verdes, atrasando o amadurecimento e prejudicando a qualidade final do fruto maduro, podendo provocar reação de hipersensibilidade em outras culturas. A dificuldade de detecção de *P. s. pv. tomato* em culturas vegetais se deve ao grande número de bactérias saprófitas filogeneticamente relacionadas e que interferem com seu crescimento em

meios semisseletivos e os sintomas similares a outras fitobacterioses (SOARES, 1993; PRESTON, 2000).

Além disso, *P. s. pv. tomato* possui a capacidade de sobreviver tanto em sementes como em exsudatos, restos de culturas, hospedeiros alternativos (como ervas daninhas) e até mesmo no solo por vários períodos. Tais meios de sobrevivência são considerados fontes de inóculo no campo e casas de vegetação (PRESTON, 2000), daí a facilidade de contato planta-bactéria e o interesse nesta interação.

Com o advento do cultivo de plantas geneticamente modificadas, teve-se o aumento da produção, porém, surgem novos conhecimentos sobre a interação planta-patógeno em vista do contato da soja transgênica com fitobactérias. Por isso, novas pesquisas visando à caracterização da resposta fisiológica em soja transgênica vêm sendo realizadas com o objetivo de esclarecer os mecanismos de tolerância a seca e resistência a doenças. Neste estudo, foi realizada a interação soja - *P. s. pv. tomato* com o intuito de estudar a reação de hipersensibilidade em soja.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterização da resposta bioquímica e fisiológica de genótipos de soja selvagem (WT) e transgênica superexpressando BiP (C9) pela quantificação da abundância de metabólitos aferíveis por GC-MS e de hormônios vegetais e metabólitos secundários aferíveis por LC-MS que responderam ao estresse por interação planta-bactéria incompatível.

3.2. Objetivos específicos

- i. Análise quantitativa e qualitativa por GC-MS para a determinação dos perfis metabólicos de folhas dos genótipos WT e C9;
- ii. Análises pela plataforma de dados *MetaboAnalyst* dos dados gerados por espectrometria de massas para a identificação dos metabólitos responsivos e processos biológicos alterados pelas condições de estudo;
- iii. Análise quantitativa por LC-MS para a determinação dos fito-hormônios e metabólitos secundários responsivos ao estresse biótico;
- iv. Integração dos dados de metaboloma obtidos por GC-MS e LC-MS para a identificação dos principais processos metabólicos envolvidos na resposta de hipersensibilidade, com ênfase nas comparações entre os resultados dos genótipos (WT e C9), resposta à inoculação (com e sem infecção) e intervalos de tempo pós-infecção (zero, 8 e 36 hpi);

4. METODOLOGIA

4.1. Inoculação de *P. s. pv. tomato* em soja em casa de vegetação

4.1.1. Cultivo das variedades de soja

O experimento de interação planta-patógeno foi montado e conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais. Sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill cv. Conquista) não transformadas, denominadas WT e sementes transformadas com o gene SoyBiPD sob controle do promotor 35S do *Cauliflower mosaic* vírus (35S::BiP-4; VALENTE *et al.*, 2009) denominadas C9, foram semeadas em vasos de plástico de 1,0 L contendo uma mistura de solo, esterco e areia na proporção 3:1:1 previamente autoclavada. Durante o crescimento, as plantas de soja foram mantidas sob condições naturais de luz, umidade relativa (65-85%) e temperatura (15-35°C) e normalmente irrigadas.

4.1.2. Preparo de *P. s. pv. tomato* para inoculação

A metodologia utilizada para infiltração de solução bacteriana em soja foi descrito por Zou e colaboradores (2005). Colônias de *P. s. pv. tomato*, obtidas no Laboratório de Populações de Fitopatógenos do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), estocada no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP) com o código pUFV 2848 caixa 59, foram crescidas em meio de cultura líquido King B, descrito por King e colaboradores (1954). Para os ensaios de estresse biótico, *P. s. pv. tomato* foi cultivada em três placas de Petri com meio King B sólido, e posteriormente transferidas para 1 L de meio King B líquido, distribuídos em três frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL autoclavados, sendo mantidas em *shaker* (Thermo) com rotação de 180 rpm a 28°C por 24 h, até atingir densidade óptica de cerca de $A_{600\text{ nm}}$ 0,900, medida em espectrofotômetro. O meio foi transferido para tubos de 250 mL e centrifugado a $9820 \times g$ por 10 min e o precipitado dissolvido em 2L de MgCl_2 10 mM.

4.1.3. Experimento em casa de vegetação

Com o intuito de verificar a efetiva eficácia do processo de inoculação de *P. s. pv. tomato* em folhas de soja, foi realizado um experimento piloto de interação planta-bactéria em casa de vegetação na UFV. Foram semeadas sementes de soja WT e C9 em cinco vasos, um para cada tratamento (WT e C9; com e sem infecção com *P. s. pv. tomato*) e um vaso com soja WT para infiltração de solução com corante *Poisson-S* para estudo das razões em caso de resultado negativo (se foi ocasionado pela inviabilidade das bactérias ou pela ineficácia do sistema de descompressão), como visualizado na Figura 3. No trigésimo dia após a semeadura, foi realizada a infiltração conforme descrito no experimento final.

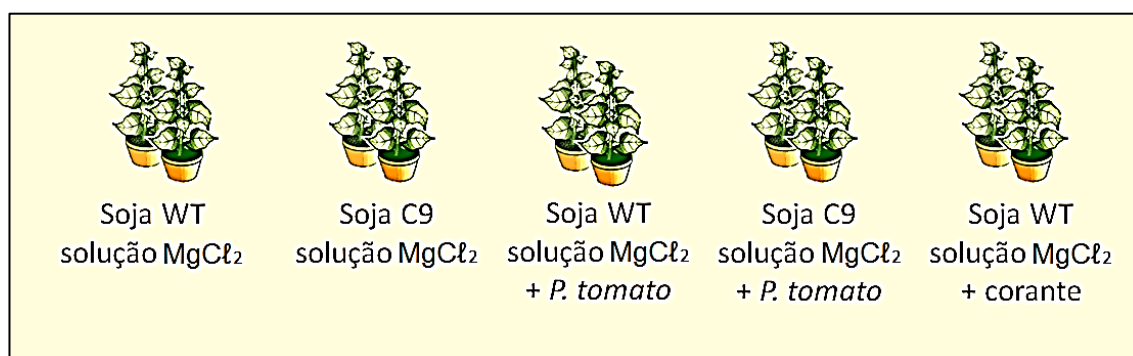


Figura 3. Representação do experimento piloto de inoculação de soja com *P. s. pv. tomato*.

Após a confirmação da eficácia do ensaio piloto, foi conduzido o experimento final de interação planta-patógeno em casa de vegetação na UFV. O experimento elaborado contou com duas variedades de soja submetidas a dois regimes de infiltração: um com solução de MgCl₂ 10 mM contendo *P. s. pv. tomato* e outro apenas com solução de MgCl₂; divididas de acordo com o tempo de coleta das folhas pós-inoculação (zero, 8 e 36 hpi), conforme demonstrado na Tabela 1. Por volta do trigésimo dia de semeadura, após a completa expansão do quarto trifólio, foi iniciado o experimento de inoculação. Todos os vasos foram infiltrados de uma vez. Para otimizar a introdução de *P. s. pv. tomato* pelos estômatos, o experimento foi realizado no período noturno e a casa de vegetação foi previamente umedecida para elevar a umidade local, favorecendo a abertura completa das células guardas dos estômatos.

Tabela 1. Esquema do experimento de inoculação de soja com *P. s. pv. tomato*.

Variedade de soja	Infecção com <i>P. s. pv. tomato</i>	Tempo de coleta das folhas (hpi*)		
		0	8	36
WT	Com infecção (CI)	WT CI 0	WT CI 8	WT CI 36
	Sem infecção (SI)	WT SI 0	WT SI 8	WT SI 36
C9	Com infecção (CI)	C9 CI 0	C9 CI 8	C9 CI 36
	Sem infecção (SI)	C9 SI 0	C9 SI 8	C9 SI 36

*hpi: horas pós-inoculação

A solução a ser infiltrada foi colocada em um béquer de 1 L e este dentro de um dessecador acoplado a um compressor a vácuo. Os vasos foram, individualmente, lacrados com sacos plásticos para evitar queda de substrato, virados ao contrário e imersos na solução. Em seguida, foi submetida a uma descompressão de 500 mmHg por 90 s – tempo suficiente para promover a entrada forçada da bactéria pelos estômatos. A coleta de todas as folhas foi realizada no devido tempo pós-inoculação (zero, 8 e 36 hpi). Para obter material suficiente e para minimizar o efeito da variação folha a folha, folhas de três plantas (seis a nove folhas) foram reunidas em um *pool*. Este foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezer* a -80°C.

Para a certificação da presença do transgene em plantas geneticamente modificadas, foi realizada a extração de DNA pelo método CTAB. Foi utilizada a técnica de PCR a partir de DNA genômico da amostra, com oligonucleotídeos específicos para amplificação do transgene. O produto da amplificação foi analisado por eletroforese de agarose 1% (p/v), cuja presença confirmou transgenia em amostras de soja C9.

4.2. Metabolômica

4.2.1. Perfis metabólicos por GC-MS

As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido e posteriormente 50 mg de material foi pesado em microtubos de 2,0 mL (Axygen). Em seguida, foram adicionados 700 μ L de metanol 100% (v/v) contendo 30 μ L de ribitol (0,2 mg/mL em água ultrapura) como normalizador interno, seguido de agitação em *vortex* por 15 s. As amostras foram agitadas em *Thermomix* a 70°C por 15 min, centrifugadas a 18.400 $\times g$ por 10 min e o sobrenadante foi coletado para um tubo novo. Adicionou-se 375 μ L de clorofórmio e 750 μ L de água ultrapura, seguido de agitação em *vortex* de 15 s. Após centrifugação a 1500 $\times g$ por 15 min, uma alíquota de 200 μ L da fase superior (fase polar) foi transferida para um tubo novo e seca em *speed vac*. Um tubo vazio foi destinado como branco. A derivatização das amostras foi realizada pela adição de 40 μ L de piridina (Merck) contendo metoxiamina hidrocloreto (20 mg/mL) (Sigma) submetendo-as a 37°C por 2 h sob agitação. Após serem centrifugados por 60 s, foram adicionados aos tubos 70 μ L da solução de MSTFA contendo FAME (20 μ L/mL) e mantidas a 37°C por 30 min. Depois de serem centrifugadas por 60 s, adicionou-se 100 μ L da amostra derivatizada a *vials* específicos para análise no sistema GC-MS (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas).

As amostras foram analisadas utilizando-se o sistema GC-MS TruTOF GC-TOF (Cromatógrafo Agilent, 7890a) e Espectrômetro TruTOF[®] HT TOFMS (Leco), equipado com coluna capilar de 30 m (MDN-35). Uma alíquota de 1,0 μ L da amostra foi injetada no modo *splitless* a 230°C carregada por gás hélio em fluxo contínuo ($\Phi = 2$ mL/min). A temperatura do forno foi conservada inicialmente a 80°C, sendo posteriormente aumentada a uma taxa constante ($\Delta T/\Delta t = 15$ °C/min), até alcançar 330°C e mantida constante ao longo de 5 min.

Os cromatogramas obtidos foram processados para correção da linha de base e alinhadas através do *software ChromaTOF*. Os espectros foram exportados no formato *.netcdf* e os compostos presentes nas amostras foram

identificados utilizando uma bibliotecas de massa espectrais de compostos derivados de trimetilsilício (TMS), obtidos do Instituto Max Planck de Fisiologia Molecular Vegetal (<http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb>). A identificação e quantificação foi realizada pelo método MST (*mass-spectral tags*) implementada pelo *software TargetSearch*, obtendo um *script* para identificar e quantificar metabólitos no programa R (CUADROS-INOSTROZA *et al.*, 2009). As intensidades dos metabólitos identificados foram normalizadas pela área do pico correspondente ao ribitol por meio do *MetaboAnalyst* e ajustadas pela massa foliar de cada amostra. As intensidades dos picos foram expressas em termos relativos para comprovar a abundância dos metabólitos identificados em resposta ao tratamento.

4.2.2. Quantificação de fito-hormônios por UHPLC-MS QqQ

As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido para rompimento do material vegetal e posteriormente foram adicionados 400 µL de uma solução extratora composta de metanol, isopropanol e ácido acético, nas proporções 20:79:1, a 110 mg de material vegetal. Cada uma das amostras foi submetida a agitação em *vortex* quatro vezes por 20 s, mantendo-as no gelo e sonicadas em um ultrassom a 4°C por 5 min, sendo incubadas em gelo por 30 min, sonicadas em ultrassom por 5 min e centrifugadas 14000 × *g* por 30 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para tubos novos, realizando-se um novo ciclo de extração com o precipitado da extração anterior para aperfeiçoar a eficiência de extração. As amostras contendo os hormônios extraídos foram armazenadas em *freezer* a -80°C para análise por cromatografia líquida de ultraperformance acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo (UHPLC-MS QqQ). Cerca de 400 µL das amostras extraídas foram transferidas para *vials* e 5,0 µL foram injetados no sistema LC/MS pertencente ao NuBioMol do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da UFV. Foi utilizada a coluna cromatográfica (*Agilent Eclipse Plus*, RRHD, 1.8 µm, 2.1 × 50 mm) com fluxo contínuo ($\Phi = 0,3$ mL/min), acoplada *online* a um espectrômetro de massa do tipo QqQ (*Agilent*). Aplicou-se o método de quantificação absoluta utilizando padrões externos. Foi gerada uma curva padrão para cada fito-hormônio puro, variando as concentrações de

1,0 a 300 ng por mL de solução extratora. Os fito-hormônios foram separados por cromatografia de ultraperformance do tipo UHPLC (*Agilent*), utilizando coluna C18 (50 mm x 1,0 mm ID, partícula de 1,7 um e 300 A), acoplada on-line a um espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo QqQ (*Agilent*). O espectrômetro de massas foi utilizado alternando o modo positivo e negativo de acordo com tempo de retenção e a amostra foi escaneada no modo MRM (*multiple reaction monitoring*) para detecção de cada fito-hormônio (Tabela 2).

Os dados coletados foram analisados no *software Skyline*, de acordo com uma tabela de transição obtida a partir dos dados do espectrômetro de massas, gerando áreas a partir dos picos. Os valores de área analisáveis foram convertidos, utilizando o programa *Excel*, em ng/g (hormônio/tecido vegetal fresco).

Tabela 2. Massas monitoradas por MRM para detecção e quantificação de fito-hormônios. A zeatina aparece duas vezes porque possui dois tipos de íons produtos formados.

Nome	Íon precursor	Íon produto	Modo
Ácido jasmônico	209	59	-
Ácido abscísico	263,1	153	-
Ácido salicílico	136,8	92,9	-
Ácido indolacético	176	129,9	+
Ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico	102,1	56,2	+
Zeatina	220	136	+
Zeatina	220	202,3	+
Metiljasmonato	225,2	151,2	+
GA4 (giberelina A4)	331	243	-
GA3 (giberelina A3)	345,1	142,9	-
Ácido naftalenoacético	185	141	-

4.2.3. Quantificação de metabólitos secundários por UHPLC-MS QqQ

As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido para rompimento do material vegetal e submetidas à mesma metodologia utilizada para os fito-hormônios (item 4.2.2).

Cerca de 400 µL das amostras extraídas foram postas transferidas para *vials* e 5,0 µL foram injetadas no sistema LC-MS. Empregou-se a mesma coluna cromatográfica utilizada para fito-hormônios e aplicou-se o método de quantificação absoluta com a utilização de padrões externos. Neste método foi gerada uma curva padrão para cada metabólito secundário puro, variando as concentrações de 1,0 a 300 ng por mL de solução extratora. Os metabólitos secundários foram separados por UHPLC-MS QqQ, do mesmo modo que em fito-hormônios. O espectrômetro de massas foi utilizado alternando o modo positivo e negativo de acordo com tempo de retenção dos metabólitos secundários e a amostra foi escaneada no modo MRM (*multiple reaction monitoring*) para detecção de cada metabólito secundário (Tabela 3).

Os dados coletados foram analisados no *software Skyline*, de acordo com uma tabela de transição obtida a partir dos dados do espectrômetro de massas, gerando áreas a partir dos picos. Os valores de área analisáveis foram convertidos, utilizando o programa *Excel*, em ng/g (metabólito/tecido vegetal fresco).

Tabela 3. Massas monitoradas por MRM para detecção e quantificação de alguns metabólitos secundários.

Nome	Íon precursor	Íon produto	Modo
4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeido	179,1	147.04; 91;119;135	+
4-hidroxi-flavona**	239,0703	137; 129	+
7-hidroxi-flavona**	239,0703	137; 129	+
Ácido 3-5 di-hidroxibenzoico	155,02661	137,01	+
Ácido 4-hidroxibenzoico	139,12	121; 65	+
Ácido benzoico	123,02	105;77; 51	+
Ácido cafeico	179	135; 163; 97	-
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	147,05	103.2; 77	-
Ácido ferúlico	193,05	134.1; 179	-
Ácido neoclorogênico	355.1; 353.1	163(+); 179 e 191(-)	+ e -
Ácido <i>p</i> -cumárico	163,04	119; 147	-
Ácido shiquímico	175; 173	132; 59.1 e 111.1	+ e -
Ácido sinápico	225; 223	207;164.1e 148.9	+ e -
Ácido siringico	199; 197	141; 121.2 e 153	+ e -
Alcool coniferílico	181	123; 137	+
Alcool sinapílico	211	133	+
Catecol	109,02	91.01; 108.01	-
Chalcona**	209,09	131.05; 103.0; 77	+
Cumarina	147,06	91; 103; 118	+
Curcumina**	367,11	173.06; 217.04	-
Daidzeína**	255; 253	199 e227; 224e 209	+ e -
Genisteína**	271.05; 269.1	243 e 133	+ e -
Isoferúlico**	193	133; 178	-
N-Propilgalato	211,2	153;170;125;168.6	-
Narigern	579,17	271.06; 459.1;151	-
Naringerina	271	150;151	-
Quercetina**	300,9	150,9	-
<i>Trans</i> 3-5 dimetoxi 4-hydroxicinâmico**	199	141	-
Vanilina	151	108;123	-

*Dissolução em 80% metanol (HPLC); diluições seriadas desde 200ng/mL até 0.1 ng/mL

**Padrões que não dissolveram em metanol 80%

5. RESULTADOS

5.1. Sintomas apresentados por folhas de soja em resposta à inoculação

Após a infiltração a vácuo do patógeno, as folhas de soja foram monitoradas nos tempos zero, 8 e 36 hpi para verificação da manifestação dos sintomas. Em 8 h, os sinais fenotípicos da morte celular não eram perceptíveis em folhas inoculadas (Figura 4, A a D), enquanto folhas de soja WT CI 36 (Figura 4E) e C9 CI 36 (Figura 4G) apresentaram formação de halos castanhos, sinal de necrose no local da infecção, em contraste com WT SI 36 (Figura 4F) e C9 SI 36 (Figura 4H), que não apresentaram sintomas. Plantas C9 apresentaram halos necrosados em maior número e abrangendo uma maior área que em plantas WT. Os sintomas de hipersensibilidade ficaram nítidos no decorrer dos dias, como se pode notar em 15 dias pós-inoculação (dpi, do inglês *days postinoculation*, Figura 4,I a L) e 30 dpi (Figura 4, M a P).

A. Soja WT CI 8 hpi



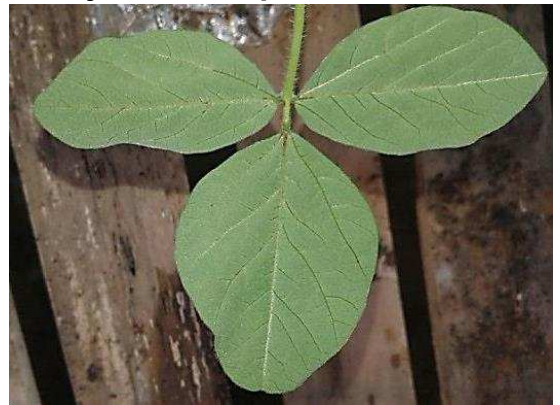
B. Soja WT SI 8 hpi



C. Soja C9 CI 8 hpi



D. Soja C9 SI 8 hpi



E. Soja WT CI 36 hpi



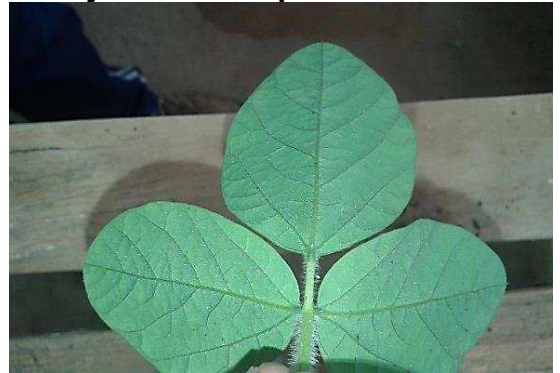
F. Soja WT SI 36 hpi



G. Soja C9 CI 36 hpi



H. Soja C9 SI 36 hpi



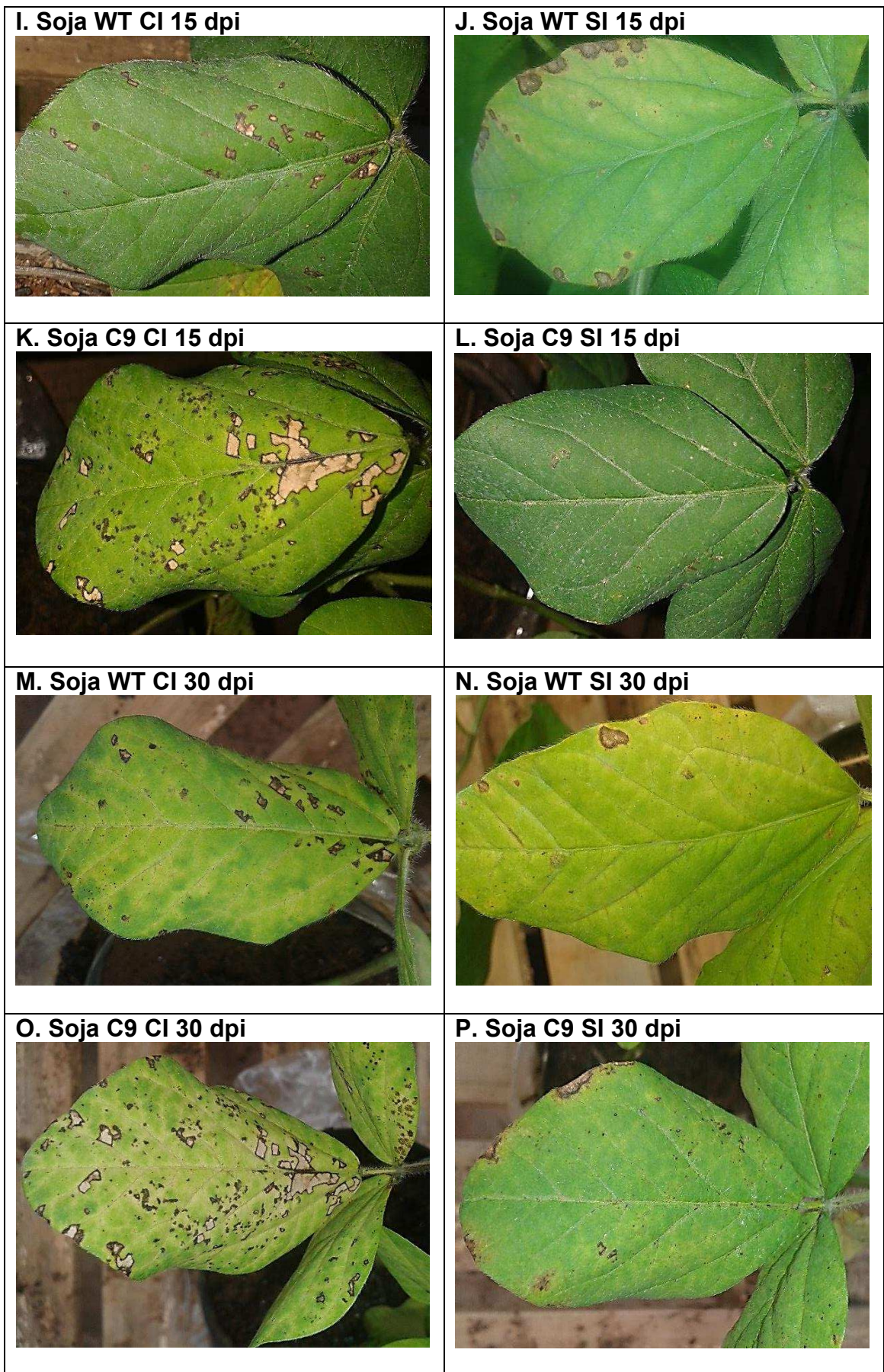


Figura 4. Fotos das folhas de soja submetidas à inoculação com *P. s. pv. tomat*.

5.2. Metabólitos responsivos determinados por análises de variância (ANOVA)

As tabelas de identificações geradas pelo *TargetSearch*, apresentando as abundâncias de cada metabólito, foram submetidas a análises estatísticas utilizando a plataforma de análise de dados *MetaboAnalyst*.

Em 8 h, não foram encontrados resultados significativos entre amostras infectadas (CI) e controle (SI). Na Tabela 4, estão indicados os metabólitos com variância significativa entre os tratamentos em amostras de soja CI e SI em 36 hpi. Pode-se observar que 10 compostos apresentaram variação em resposta aos tratamentos de infiltração de *Pseudomonas*. A N-acetilgalactosamina (GalNAc) e a di-hidroesfingosina (DHS) foram os compostos que responderam mais significativamente ao tratamento.

Tabela 4. Metabólitos significativos na ANOVA determinados em amostras de soja CI e SI em 36 hpi.

Nome	<i>f.value</i>	<i>p.value</i>	<i>-log p</i>	<i>FDR</i>
N-Acetilgalactosamina	14.789	7.1063e-05	4.1484	0.0049033
Di-hidroesfingosina	11.022	0.00035959	3.4442	0.012406
Alanina	10.179	0.00054288	3.2653	0.012486
α -Aminobutirato (AABA)	8.935	0.0010392	2.9833	0.017926
Ácido 3-metil-pentanodioico	8.0393	0.0017162	2.7654	0.023683
Arbutina (<i>p</i> -hidroxifenil- β -glicose)	7.676	0.0021226	2.6731	0.02441
Ácido glucoeptônico lactona	6.4287	0.0046062	2.3367	0.041401
Ácido glucoeptônico	6.3656	0.0048001	2.3187	0.041401
γ -Aminobutirato (GABA)	6.1427	0.0055611	2.2548	0.042635
Loganina	5.8678	0.0066925	2.1744	0.046179

Os dados dos compostos que apresentaram alteração significativa estão representados no diagrama de caixa (Figura 5), sobretudo em plantas WT em relação a C9 e em WT CI em relação a C9 CI. Os resultados em plantas CI e SI e em 36 hpi auxiliam no entendimento de quais compostos tiveram suas concentrações relativas modificadas, seja pelo estresse biótico (interação planta-bactéria) ou pelo estresse abiótico (devido ao efeito mecânico da descompressão e/ou da entrada de solução de $MgCl_2$ nos estômatos). Para compostos que apresentaram diferença significativa em plantas CI quando comparadas com SI, pode-se afirmar que atuam favoravelmente na ocorrência de HR.

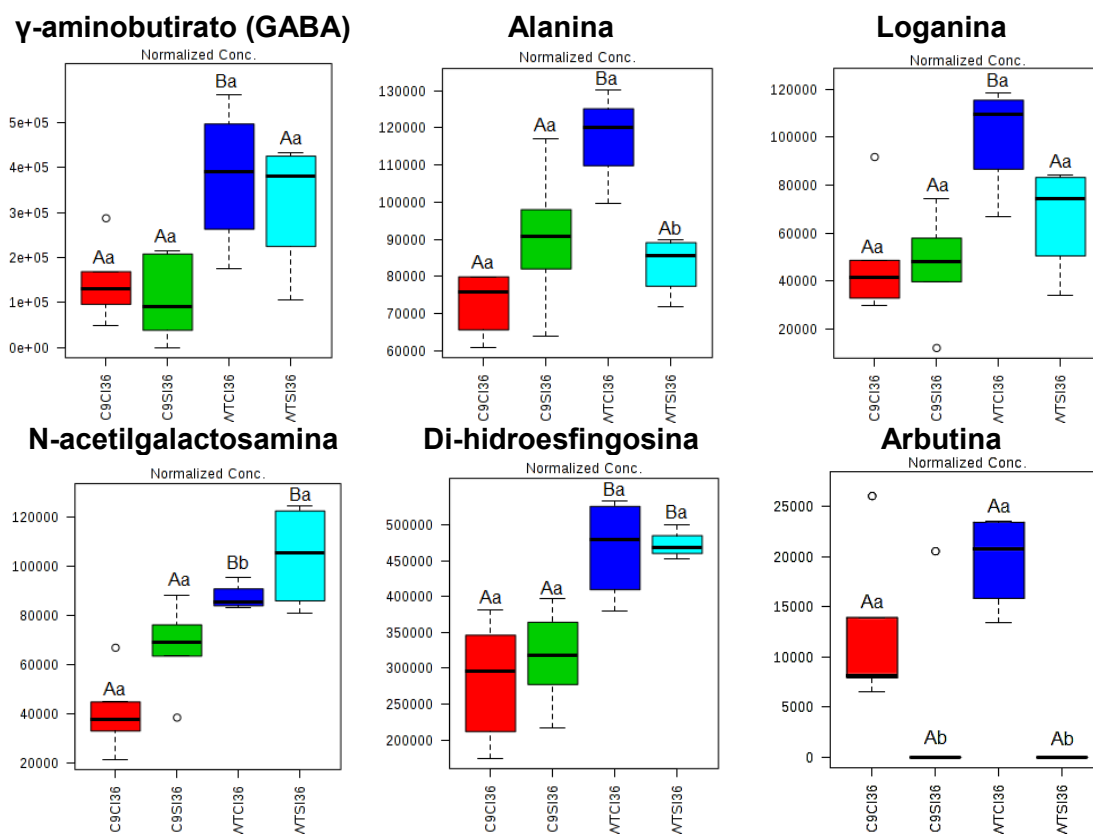


Figura 5. Abundância relativa de alguns metabólitos significativos obtidos por CG-MS. Diagrama de caixa para valores normalizados de concentração relativa em amostras de soja em 36 hpi. A estatística foi realizada a partir do *Metaboanalyst*. Dados seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras maiúsculas correspondem aos genótipos e minúsculas aos tratamentos.

Por sua vez, na Tabela 5 estão indicados os metabólitos com variância significativa entre os tratamentos em amostras de soja WT CI e C9 CI em função do tempo pós-inoculação. Pode-se observar que 22 compostos apresentaram variação em resposta aos tratamentos em zero, 8 e 36 hpi. Os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA, *branched-chain amino acid*) foram os compostos que responderam mais significativamente ao longo do tempo.

Tabela 5. Metabólitos significativos na ANOVA determinados em amostras de soja CI em função do tempo.

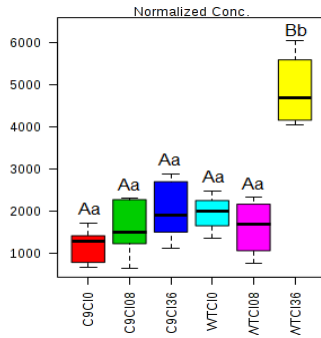
Nome	<i>f.value</i>	<i>p.value</i>	<i>-log p</i>	<i>FDR</i>
Leucina	28.246	2.5773e-09	8.5888	1.1215e-07
Valina	27.756	3.0726e-09	8.5125	1.1215e-07
Isoleucina	23.245	1.771e-08	7.7518	4.1756e-07
Arbutina (<i>p</i> -hidroxifenil- β -glicose)	22.638	2.288e-08	7.6405	4.1756e-07
Alanina	20.427	6.112e-08	7.2138	8.9236e-07
α -Aminobutirato (AABA)	18.54	1.5139e-07	6.8199	1.8419e-06
γ -Aminobutirato (GABA)	12.678	4.3054e-06	5366	4.4899e-05
Eritrose	12.455	4.9912e-06	5.3018	4.5545e-05
N-Acetilgalactosamina	11.119	1.2565e-05	4.9008	0.00010192
Ácido 3-metil-pentanodioico	9.0683	6.0199e-05	4.2204	0.00043945
Ácido hexacosanoico	6.9982	0.00036828	3.4338	0.0024264
Ácido glucárico-1,4-lactona	6.9137	0.00039887	3.3992	0.0024264
Di-hidroesfingosina	6.6581	0.00050928	3293	0.0028264
Ácido fenilpirúvico	6.5936	0.00054205	3266	0.0028264
Acido Lactobiônico	6.3251	0.0007051	3.1518	0.0034315
Glicerol	5.4507	0.0017264	2.7629	0.0076631
Loganina	5.4195	0.0017846	2.7485	0.0076631
Galactinol	5.1011	0.0025137	2.5997	0.010195
Ácido nervônico (ácido 15-Z-tetracosenoico)	4.5642	0.0045711	2.34	0.017563
7,8-Di-hidroneopterina	3.9239	0.0096599	2015	0.035259
Acido Eicosanoico	3.7475	0.011953	1.9225	0.041551
<i>myo</i> -Inositol	3.5594	0.015052	1.8224	0.049946

A partir dos resultados obtidos por ANOVA, realizado pela plataforma *MetaboAnalyst*, pôde-se analisar estatisticamente o efeito temporal do tratamento nos genótipos monitorados (Figura 6). Comparando a abundância de metabólitos pelas cultivares, notou-se que nos tempos zero e 8 hpi, não houve perturbações significativas na abundância relativa dos metabólitos tanto em plantas WT quanto C9. Já para plantas após 36 hpi, foi observado um aumento significativo da concentração relativa para o genótipo WT em comparação com o genótipo C9 para a maioria dos compostos. Dentre estes compostos encontram-se esfinganinas como a DHS, ácidos orgânicos insaturados como o ácido nervônico (ácido 15-*cis*-tetracosenoico), iridoides (monoterpenoides glicosilados, um metabólito secundário) como a loganina, açúcares e derivados como a eritrose, arbutina (*p*-hidroxifenil- β -glicose, um metabólito secundário) e N-acetilgalactosamina (GalNAc) e aminoácidos como alanina e os BCAA (leucina, isoleucina e valina).

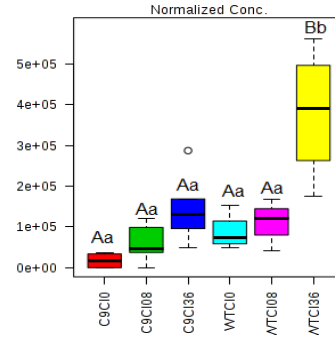
A análise temporal dos níveis dos compostos mostrou um comportamento diferenciado para cada genótipo. Para plantas C9, a maioria dos compostos não apresentou resposta temporal significativa em suas concentrações relativas, à exceção da alanina, arbutina e BCAA, que apresentaram um aumento em plantas 36 hpi em comparação aos tempos zero e 8 hpi. Para plantas WT, os principais compostos que apresentaram incremento significativamente relevante foram os açúcares e derivados, alanina e BCAA, que aumentaram em plantas 36 hpi em comparação com plantas no tempo zero e 8 hpi.

Porém, no tempo 36 hpi, se constatou alterações significativas entre tratamentos para alguns metabólitos primários, sobretudo em plantas WT, cujo incremento foi maior que em plantas C9, como pôde ser observado nos gráficos de caixa.

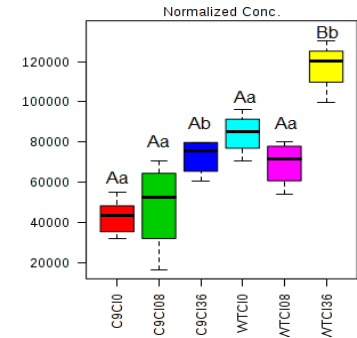
α -aminobutirato (AABA)



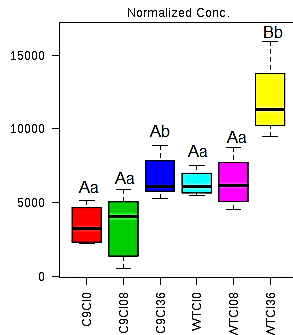
γ -aminobutirato (GABA)



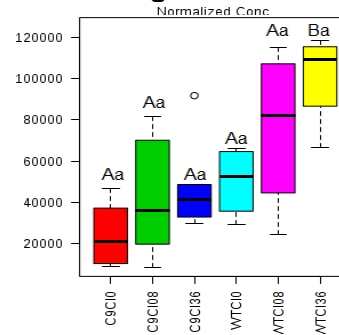
Alanina



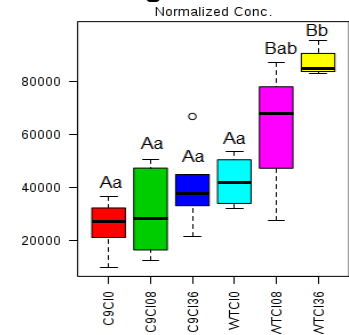
Eritrose



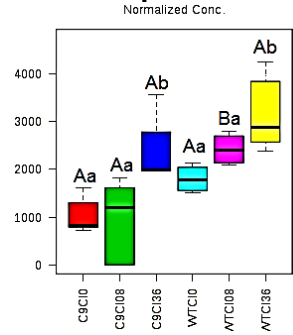
Loganina



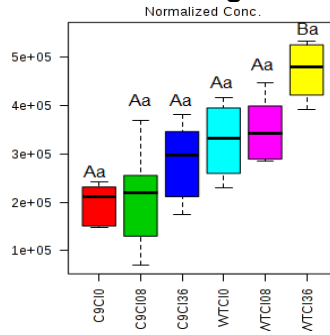
N-acetilgalactosamina



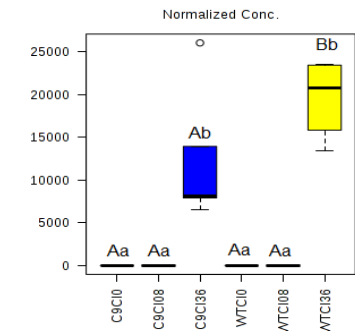
Fenilpiruvato



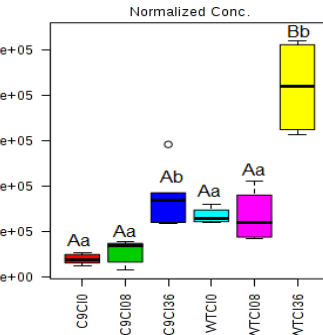
Di-hidroesfingosina



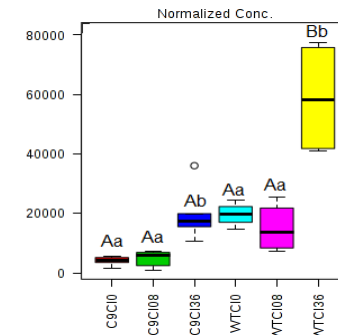
Arbutina



Leucina



Isoleucina



Valina

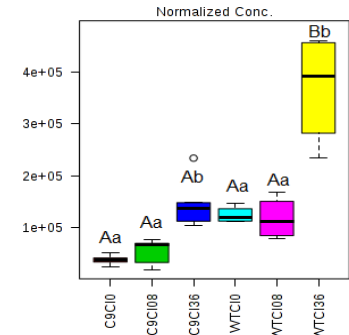


Figura 6. Abundância relativa de alguns metabólitos significativos obtidos por CG-MS. Diagrama de caixa para valores normalizados de concentração relativa em amostras de soja em plantas CI. A estatística foi realizada a partir do *Metaboanalyst*. Dados seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras maiúsculas correspondem aos genótipos e minúsculas aos tratamentos.

5.3. Análise discriminante dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA)

O procedimento de análise discriminante com o método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) permite determinar como as amostras se agrupam em função das variáveis significativamente mais importantes. O gráfico gerado (bi ou tridimensional) representa tendência específica dos mecanismos de resposta ao estresse. Portanto, o agrupamento das repetições das amostras e a separação entre os genótipos e os tratamentos denota o *modus operandi* do metabolismo vegetal em resposta à interação com *P. s. pv. tomato* intrínseco ao cultivar.

Com o intuito de compreender os mecanismos bioquímicos e fisiológicos de resposta à interação entre os parâmetros genótipo, tratamento e tempo, foi realizada uma PLS-DA a partir da tabela de identificação e picos de intensidade dos metabólitos obtidas por GC-MS, *TargetSearch*, com o intuito de verificar se a interação planta-bactéria em estudo modificou significativamente o metabolismo dos genótipos (Figura 7).

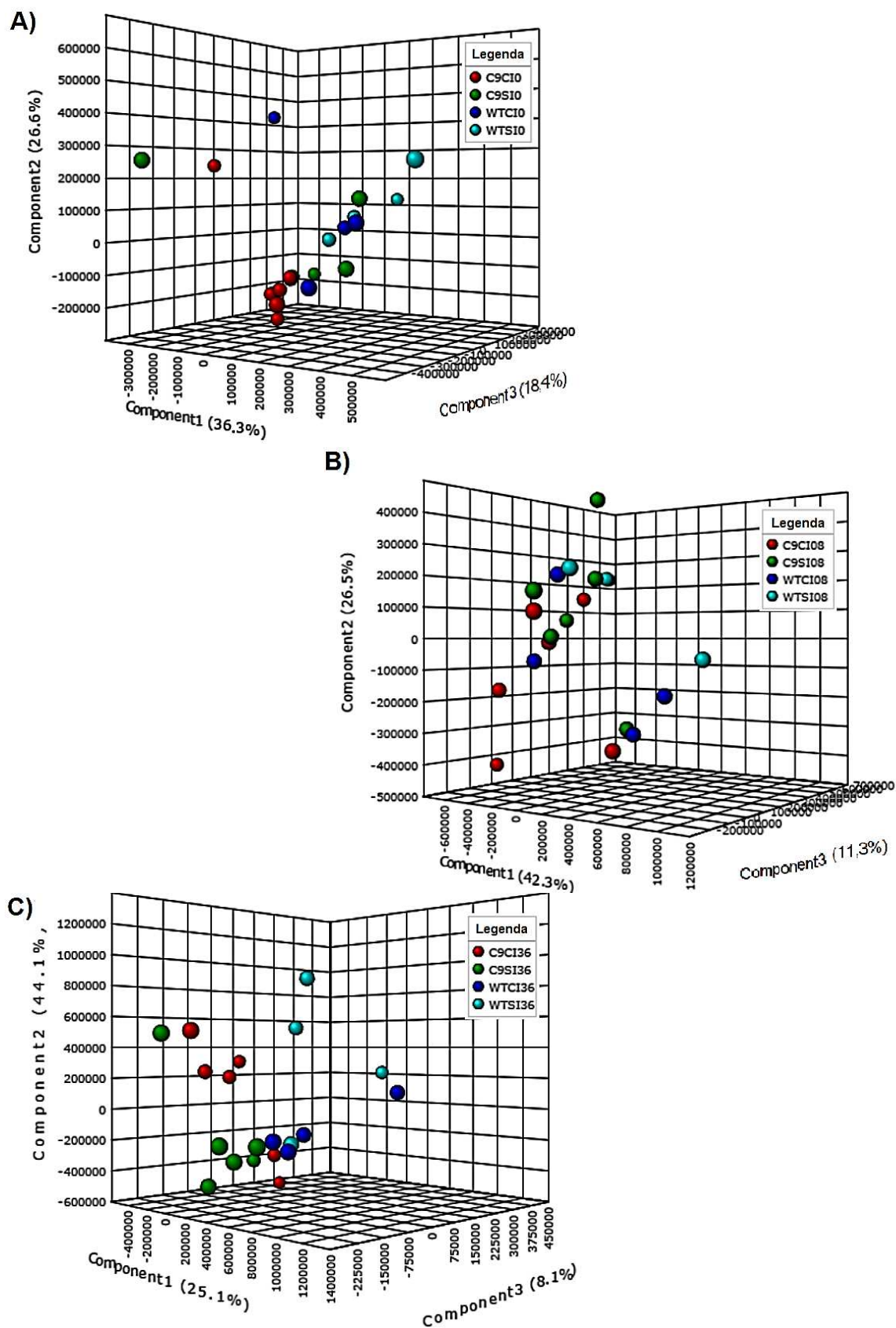


Figura 7. Análise dos PLS-DA tridimensional em soja WT e C9 em condições com (CI) e sem infecção (SI) com *P. s. pv. tomato*, pelo *MetaboAnalyst*. (A) tempo zero; B) tempo 8 hpi; C) tempo 36 hpi.

Foram realizados estudos de PLS-DA em dois níveis: o comportamento dos genótipos submetidos aos tratamentos CI e SI ao longo dos tempos zero, 8 hpi e 36 hpi (Figura 7A, 7B e 7C, respectivamente), para confirmar se houve variação nos componentes devido a infecção bacteriana, bem como o comportamento dos genótipos CI em função do tempo (WT, Figura 8, e C9, Figura 9), para confirmar se houve modificação temporal no comportamento das variáveis.

A soma dos valores dos três primeiros componentes (C1, C2 e C3) das PLS-DA dos tempos zero, 8 hpi e 36 hpi forneceram uma explicação entre 75 e 80% do total de variância. Quando se compara os gráficos *score plot* tridimensionais com a soma dos componentes dos mesmos, percebe-se que não há uma tendência de separação nítida entre as amostras CI e SI nem um agrupamento compacto entre os tratamentos, tempos e/ou genótipos, mas sim um tênue padrão comportamental entre os tratamentos para ambos os genótipos que sofre alterações ao longo do tempo. Isto significa que as respostas da maioria dos metabólitos são distinguíveis entre os genótipos e entre os tratamentos e que são poucos os metabólitos que sofrem alteração em suas concentrações em condições de infecção com *P. s. pv. tomato*.

Em 8 hpi (Figura 7B), em comparação com o tempo zero (Figura 7A), houve um espalhamento dos componentes de modo quase aleatório, não se podendo, desse modo, inferir se o comportamento das variedades CI é similar ou não ao comportamento SI. Os componentes ficaram espalhados de modo randômico, o que pode significar um rearranjo nas vias metabólicas do vegetal com o objetivo de melhor responder às alterações provocadas pelo tratamento.

Em 36 hpi (Figura 7C), todavia, houve um leve agrupamento dos tratamentos e uma separação entre os genótipos, quando comparado aos tempos zero e 8 hpi, indicando um padrão de comportamento dos componentes decorrente das condições de estresse biótico. Esta separação fica mais evidente ao se comparar o *score plot* bidimensional dos tratamentos CI para os genótipos WT (Figura 8) e C9 (Figura 9).

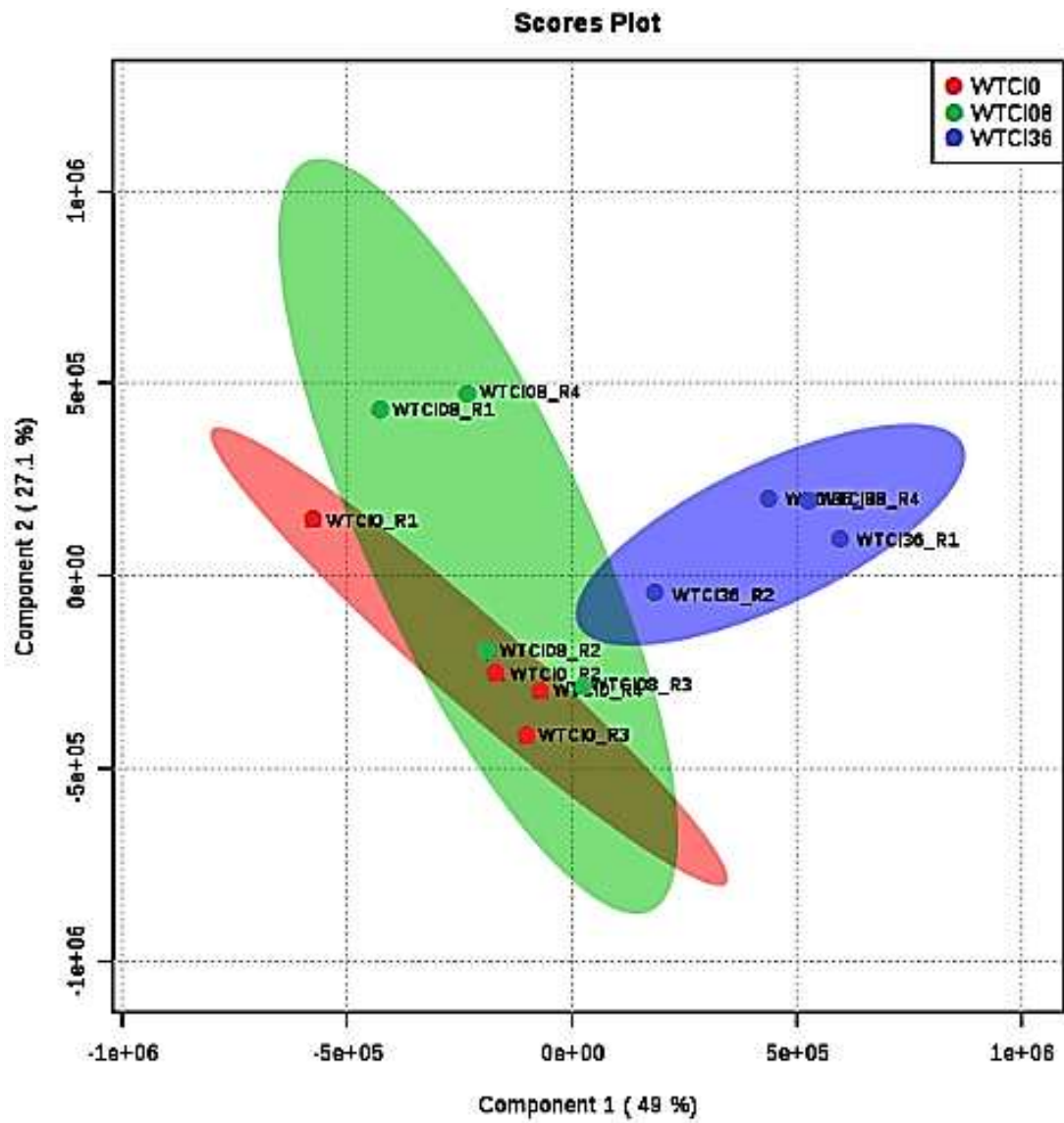


Figura 8. Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Análise dos PLS-DA bidimensional em plantas de soja inoculadas com *P. s. pv. tomat*, realizada pelo *MetaboAnalyst*. Genótipo WT. O símbolo *_Rx* indica o número de repetição do tratamento.

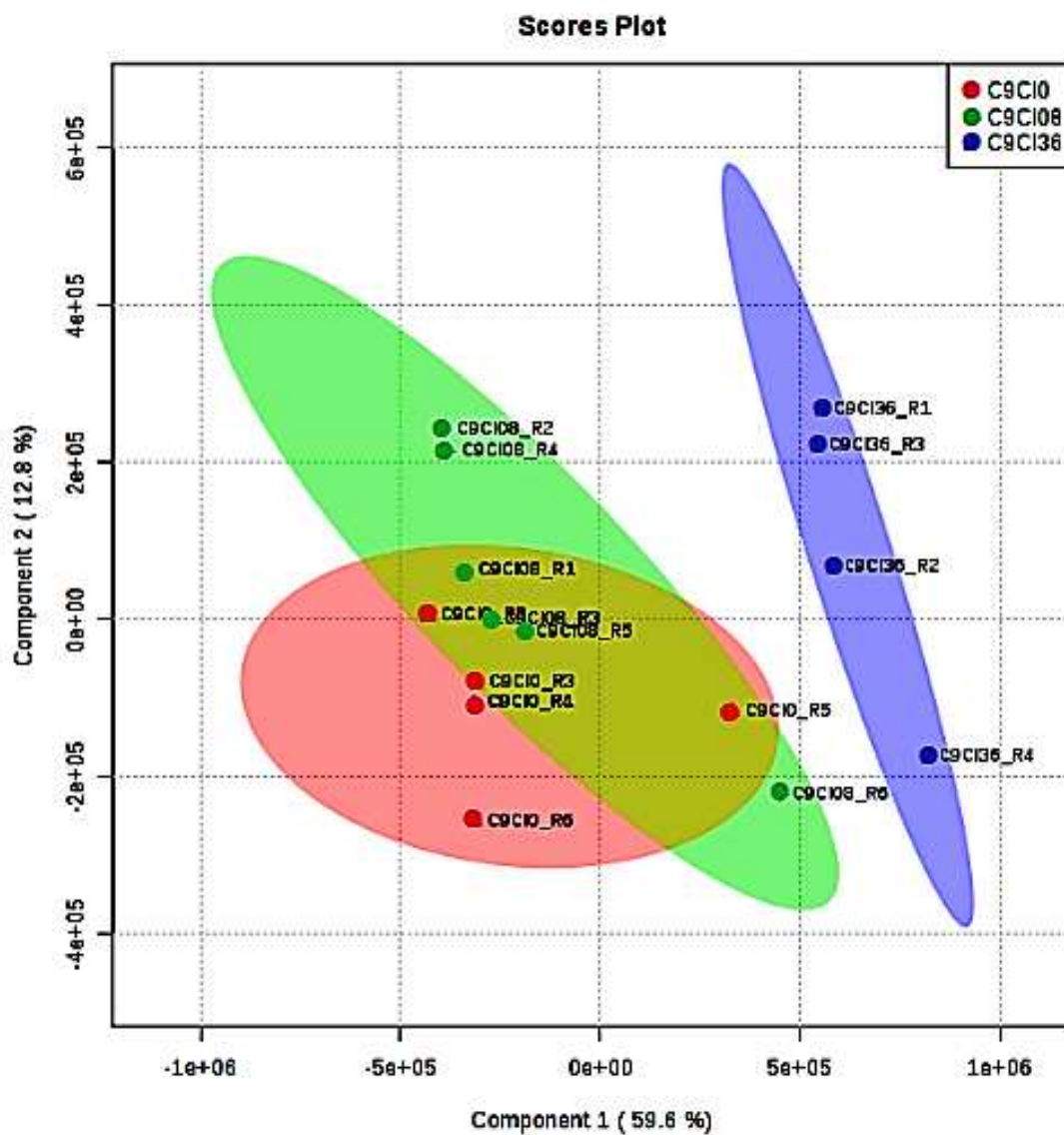


Figura 9. Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Análise dos PLS-DA bidimensional em plantas de soja inoculadas com *P. s. pv. tomato*, realizada pelo *MetaboAnalyst*. Genótipo C9. O símbolo *_Rx* indica o número de repetição do tratamento.

Para os padrões de respostas a 36 hpi obtidos no PLS-DA bidimensional e pela soma dos componentes (76,1% em WT e 72,4% em C9), pode-se notar uma leve separação entre os tratamentos e as variedades. Isto pode ser devido ao tipo de estresse sofrido pelo vegetal, o espaço de tempo decorrido após a inoculação da bactéria ou ainda pela heterogeneidade da HR ao longo das células vegetais foliares, que levaria a subestimar os resultados da interação por comportar, nos resultados, células que sofreram e que não sofreram reação de hipersensibilidade. Deve-se ainda considerar se a HR não se consolidou plenamente em 36 hpi. Neste caso, devem-se realizar análises em tempos pós-inoculação maiores.

5.4. Análise das variáveis importantes na projeção

5.4.1. Caracterização metabólica por análise do *vip score*

Pelo método de PLS-DA também se pode determinar as variáveis significativas mais importantes (principais metabólitos), aqueles que apresentaram variações expressivas da concentração relativa em função dos tratamentos aplicados. Inclusive, essas variáveis constituem os componentes utilizados para a construção do *score plot* e são responsáveis pelo perfil de agrupamento das amostras.

Os metabólitos mais importantes foram localizados ao apresentarem elevado valor de *vip score* (índice de importância). Com o intuito de se ter uma referência comparativa aos demais tempos, foi gerado o *vip score* do tempo zero (Figura 10). A abundância relativa dos compostos foi maior em plantas WT em comparação com plantas C9, sendo que os identificados por PLS-DA foram DHS, fumarato, GABA (ácido 4-aminobutanoico), leucina e valina.

Em contraste, o perfil dos principais compostos identificados por PLS-DA modificou-se após oito horas (Figura 11). Malonato e succinato se destacaram como metabólitos com maior *vip score* em relação aos demais, seguido da DHS e fumarato. Outros compostos são, em sua maioria, açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos de cadeia curta. Em plantas WT, as concentrações relativas das variáveis para ambos os tratamentos foram maiores que em plantas C9 para quase todas as variáveis. A exceção foi o

fumarato, cuja abundância relativa foi maior em C9. De maneira geral, a maior parte dos compostos em plantas WT apresentou concentração relativa maior em plantas CI (nove dos 15 compostos). Entretanto, em plantas C9, quase todos os compostos apresentaram concentrações relativas maiores em plantas SI.

Nas amostras coletadas em 36 hpi (Figura 12), os 15 principais compostos responsivos ao estresse foram, em sua maioria, açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos de cadeia curta e longa. Fumarato, gama-aminobutirato (GABA) e DHS foram os principais metabólitos que responderam ao estresse no *vip score*. Do ponto de vista de tratamentos CI, à exceção do malonato, todos os compostos foram maiores em WT que em C9. O malonato, inclusive, se mostrou em maior concentração relativa nas plantas SI. A concentração relativa dos compostos foi alta em oito dos 15 em plantas WT CI, ao passo que, em plantas C9 CI, foi baixa em 12 dos 15 compostos principais. Em plantas WT, as concentrações relativas das variáveis no tratamento CI e SI foram maiores para 13 variáveis. As exceções foram succinato e ácido eritrônico, cuja abundância relativa foi maior em C9 CI.

Quando se compara o *vip score* de plantas CI (Figura 13), ficou mais evidente o nível elevado das concentrações relativas dos metabólitos em plantas WT em comparação com as C9. Das 15 variáveis analisadas por *vip score*, 13 sofreram aumento temporal em suas concentrações relativas em plantas C9, enquanto o fumarato e a tagatose sofreram diminuição. Em plantas WT, todas as variáveis aumentaram de zero a 36 hpi.

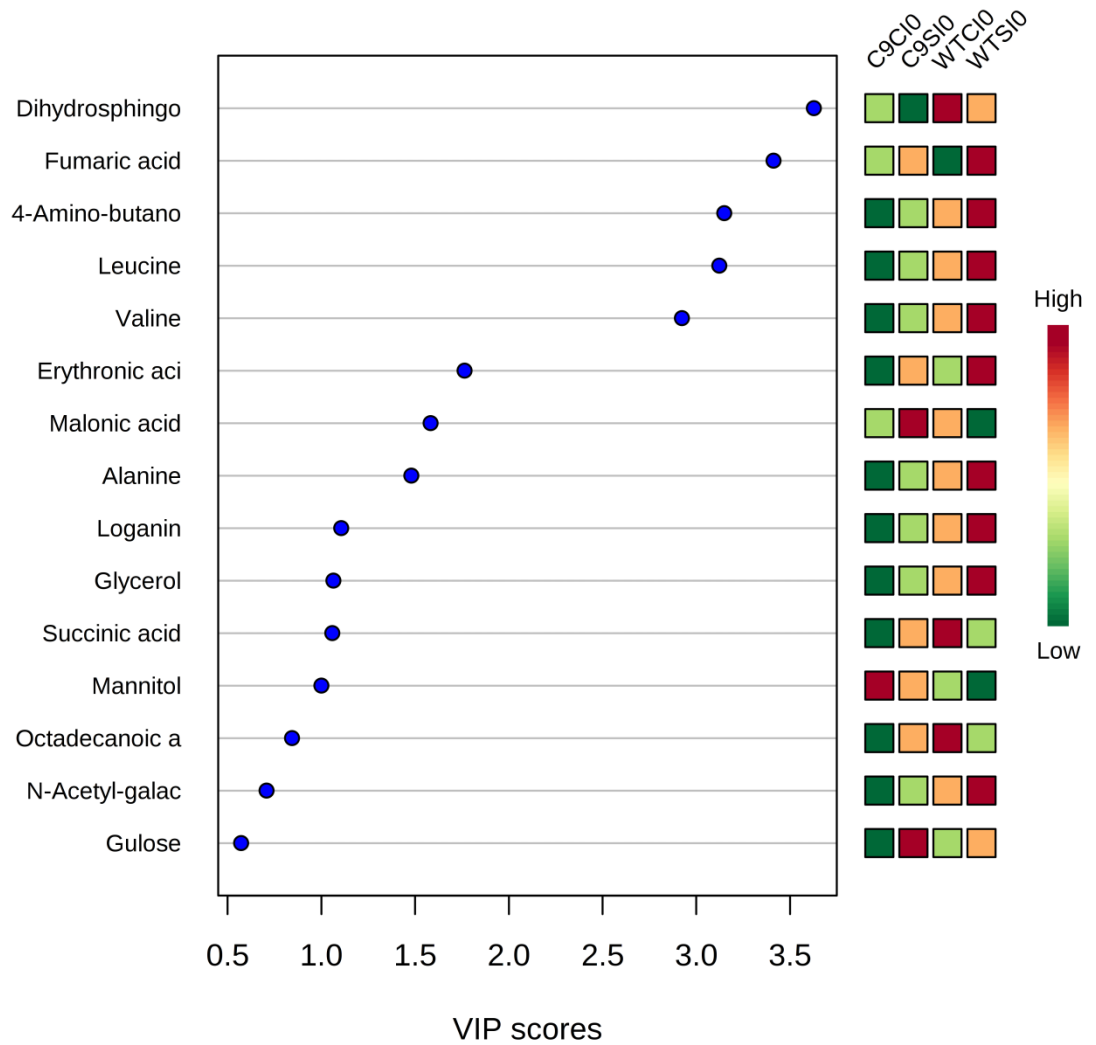


Figura 10. Análise das variáveis importantes na projeção (*vip*). Principais metabólitos responsáveis pela discriminação entre grupos de soja no tempo zero, identificados em ordem decrescente pelo *vip score*. As cores indicam, em gradiente, a maior (vermelho) ou menor (verde) concentração relativa do metabólito, enquanto o valor do *vip score* indica a importância da variável.

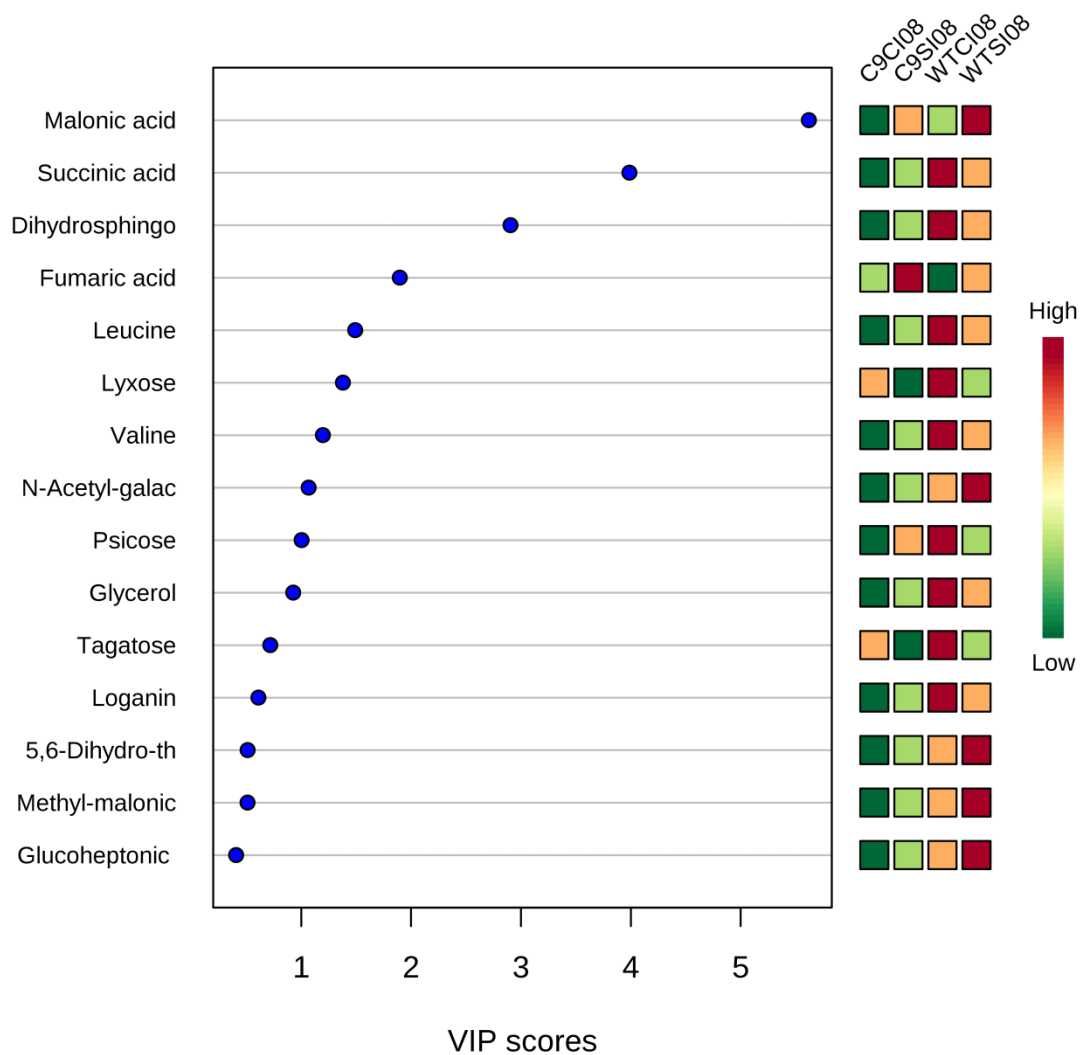


Figura 11. Análise das variáveis importantes na projeção (*vip*). Principais metabólitos responsáveis pela discriminação entre grupos de soja em 8 hpi, identificados em ordem decrescente pelo *vip* score. As cores indicam, em gradiente, a maior (vermelho) ou menor (verde) concentração relativa do metabólito, enquanto o valor do *vip* score indica a importância da variável.

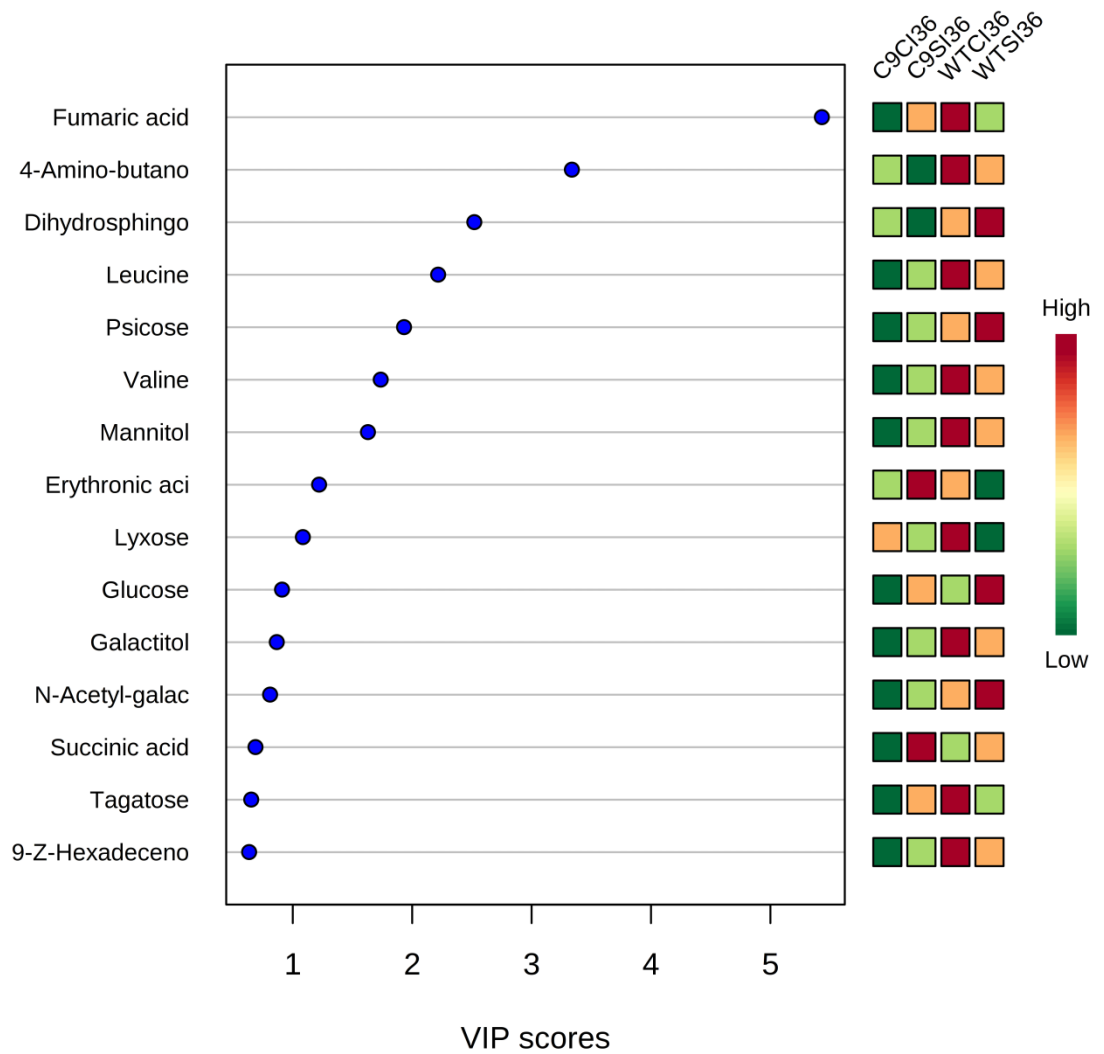


Figura 12. Análise das variáveis importantes na projeção (*vip*). Principais metabólitos responsáveis pela discriminação entre grupos de soja em 36 hpi, identificados em ordem decrescente pelo *vip* score. As cores indicam, em gradiente, a maior (vermelho) ou menor (verde) concentração relativa do metabólito, enquanto o valor do *vip* score indica a importância da variável.

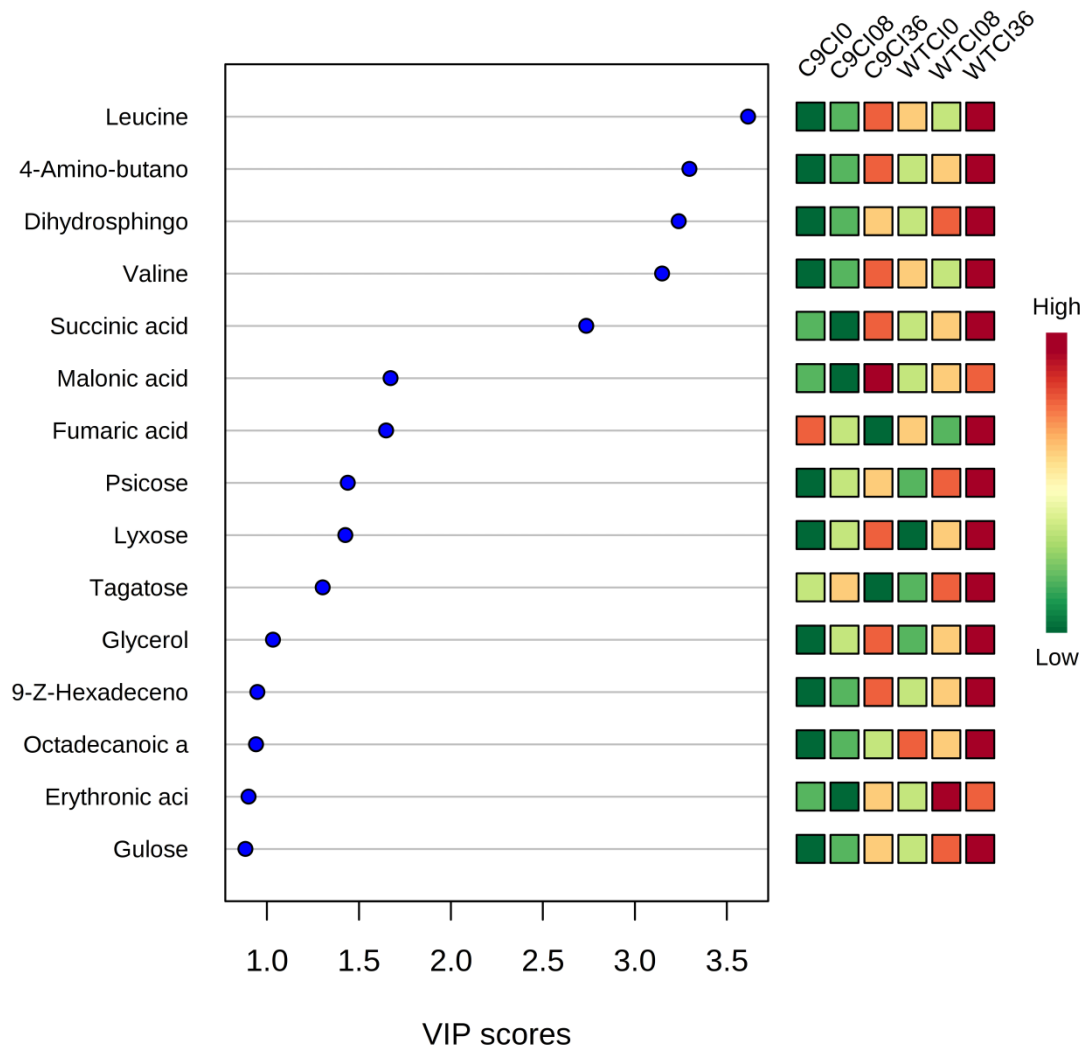


Figura 13. Análise das variáveis importantes na projeção (*vip*). Principais metabólitos responsáveis pela discriminação entre grupos de soja em resposta à interação planta-bactéria, identificados em ordem decrescente pelo *vip score*. As cores indicam, em gradiente, a maior (vermelho) ou menor (verde) concentração relativa do metabólito, enquanto o valor do *vip score* indica a importância da variável.

5.4.2. Caracterização metabólica por análise do *fold change*

Para se determinar quais metabólitos apresentaram elevação ou redução de sua concentração relativa em condições de infecção bacteriana, foi realizada uma análise de *fold change* (FC). Como no FC se comparam dois tratamentos, os valores foram calculados de dois modos: relacionando os genótipos em 36 hpi em condições com e sem inoculação [WTCl36/WTSI36 (Tabela S1) e C9CI36/C9SI36 (Tabela S2)], e relacionando os genótipos com inoculação nos tempos zero e 36 hpi [WTCl0/WTCI36 (Tabela S3) e C9CI0/C9CI36 (Tabela S4)].

A análise de FC para WTCl36/WTSI36 (Tabela S1) indicou nove compostos significativos, dentre açúcares e ácidos orgânicos. A arbutina apresentou, após a inoculação, um aumento de quase 40.000 vezes em sua concentração relativa, ao passo que o malato aumentou mais de 1300 vezes.

A análise de FC para C9CI36/C9SI36 (Tabela S2) revelou que dez compostos reagiram ao tratamento, sendo que o ácido eritrônico-1,4-lactona aumentou 765 vezes. A maioria dos compostos são açúcares e compostos fenólicos, precursores de metabólitos secundários, perfil diferente do apresentado pela WT.

A análise de FC para WTCl0/WTCI36 (Tabela S3) mostrou que açúcares, ácidos orgânicos e BCAA responderam expressivamente ao estresse ao longo do tempo, com destaque para a lixose (aumento de 360.000 vezes), sacarídeo raro que participa da formação da parede celular (ECMDB, 2017), e a arbutina (aumento de 40.000 vezes), um composto fenólico glicosilado importante na redução dos efeitos das ROS na camada lipídica das membranas celulares (MANDAL *et al.*, 2010).

O *fold change* de plantas C9CI0/C9CI36 (Tabela S4) demonstrou, ao longo do tempo, a resposta de compostos diversos, como açúcares, ácidos carboxílicos de cadeia curta e longa, BCAA e compostos da via dos fenilpropanoides, destacando também um aumento significativo de lixose e arbutina, cujo incremento foi menor que o observado em plantas WT.

5.5. Análise de fito-hormônios e metabólitos secundários por LC-MS

5.5.1. Análise de fito-hormônios

A inoculação de plantas com *P. s. pv. tomato* revelou que, ao longo do tempo, o vegetal sofre alterações visíveis em sua morfologia e fisiologia. Com o intuito de analisar quais compostos estão relacionados a estas alterações e por meio da espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (LC-MS), foi realizado um estudo da variação das concentrações de fito-hormônios comparando os tratamentos CI e SI em 36 hpi (Figura 14A) e os tratamentos zero, 8 e 36 hpi em CI (Figura 14B).

Comparando plantas CI e SI, foi observado um aumento na abundância para alguns hormônios vegetais monitorados quando os genótipos de soja foram submetidos à inoculação com *P. s. pv. tomato*.

Uma exceção interessante foi a concentração de ácido abscísico, que diminuiu em plantas CI a 36 hpi. Os níveis de ABA em plantas C9 CI foram 35% menores e em plantas WT CI, esta redução chegou a 55%.

O ácido indolacético, uma auxina, apresentou uma significativa elevação de 3,8 vezes para plantas C9 CI em 36 hpi em comparação a plantas SI, ao passo que, em cultivares WT em 36 hpi, plantas CI apresentaram níveis 1,9 vezes maior em relação às SI.

A concentração de ácido jasmônico sofreu alteração significativa, comparando plantas CI e SI, somente em variedades C9 em 36 hpi, com um acréscimo de 70%. Similarmente, o ácido salicílico apresentou tendência de aumento, em 36 hpi, em plantas C9 CI com relação a plantas C9 SI, ao passo que, em plantas WT em 36 hpi, os níveis foram levemente maiores em plantas SI. Não houve alterações significativas nos níveis do ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor imediato do gás etileno, e zeatina, uma citocinina, quando se comparou genótipos CI e SI.

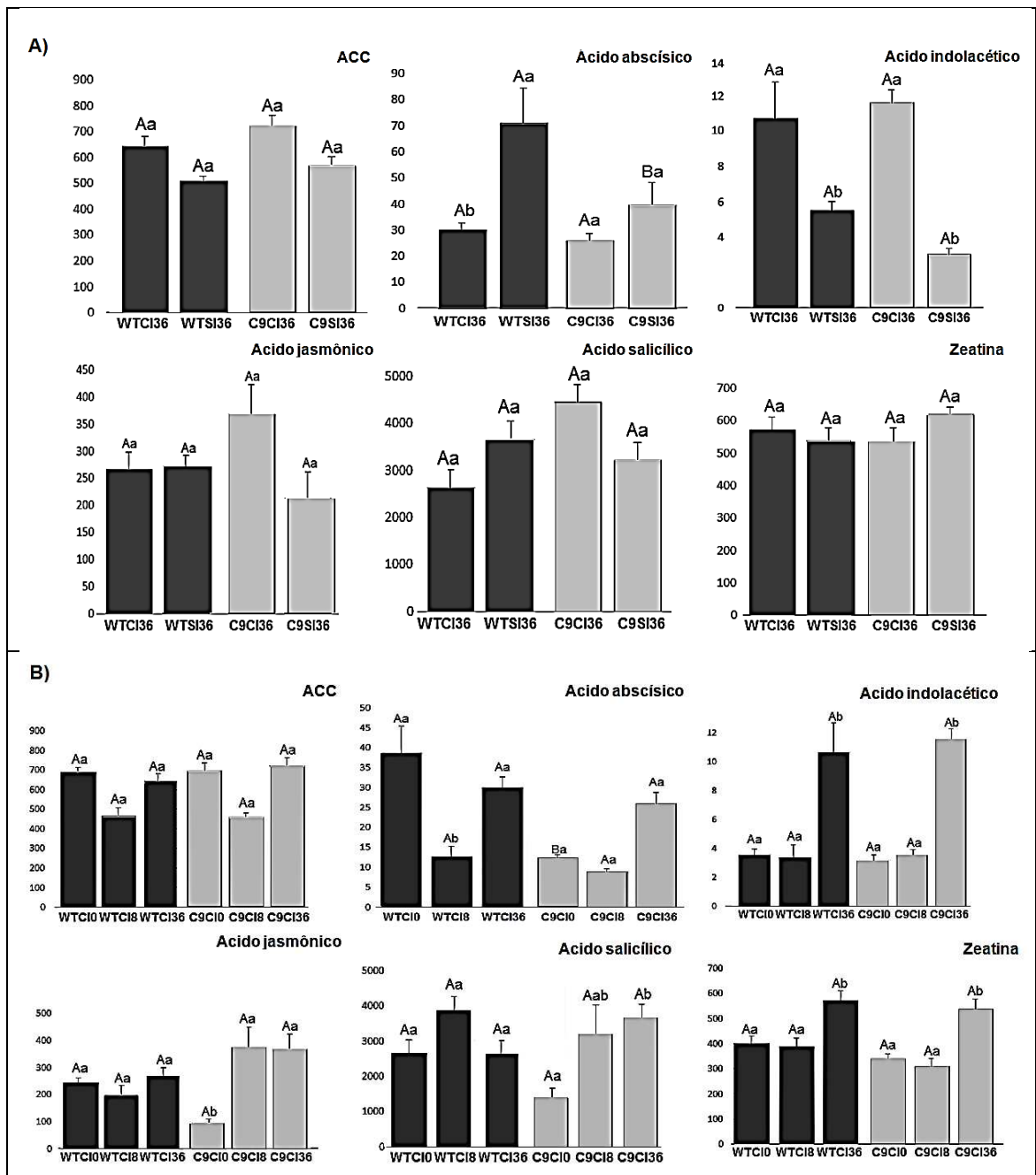


Figura 14. Quantificação de fito-hormônios (ng/g) em amostras de soja A) com e sem infecção em 36 hpi e B) resposta temporal à inoculação com *P. s. pv. tomato*. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=4). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras maiúsculas correspondem aos genótipos e minúsculas aos tratamentos (com e sem infecção). ACC: ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico.

Ao se comparar os genótipos infectados com *P. s. pv. tomato*, constatou-se que, para o tempo zero, os níveis de fito-hormônios se mantiveram equivalentes tanto em variedades WT quanto em C9, isto é, a razão entre as

concentrações de hormônios em C9 e as de WT esteve próxima de um, à exceção de ABA, JA e SA.

O ABA, em plantas C9, se mostrou somente um terço dos níveis apresentados em plantas WT, sendo que, depois de 36 h, a concentração representava 80% dos níveis encontrados em WT. O SA apresentou níveis, em plantas C9 no tempo zero, aproximadamente 50% menores aos das plantas WT, sendo que, em 36 hpi, tal percentual passou a ser 40% maior que em WT. Este aumento da concentração de SA em plantas C9 em comparação às WT também foi demonstrado para o JA. A concentração de JA foi maior em plantas C9 infectadas (3,8 vezes entre zero e 36 hpi), assim como a concentração de SA sofreu um significativo aumento em plantas C9 (2,6 vezes entre zero e 36 hpi), ao passo que, para o genótipo WT, não houve variação significativa desses hormônios com a imposição do estresse biótico.

Ao se comparar a variação nos níveis entre zero e 36 hpi, o AIA apresentou o aumento mais significativo dentre os fito-hormônios, de 3,7 vezes para plantas C9 e de 3,0 vezes para plantas WT. A zeatina apresentou um comportamento homogêneo tanto para o genótipo WT quanto para C9, com um aumento de cerca de 50% em suas concentrações monitoradas entre zero e 36 hpi. O ACC não apresentou alterações significativas durante os intervalos de tempo pós-infecção monitorados.

5.5.2. Análise de metabólitos secundários

Também foi realizado um estudo da variação das concentrações dos metabólitos secundários comparando os tratamentos CI e SI em 36 hpi (Figura 15A) e os tratamentos CI em zero, 8 e 36 hpi (Figura 15B). Dos 29 compostos (Tabela 3), seis apresentaram resultados analisáveis. Dentre estes, houve um aumento significativo em cinco compostos. Somente a cumarina não apresentou alteração significativa na comparação entre os tratamentos.

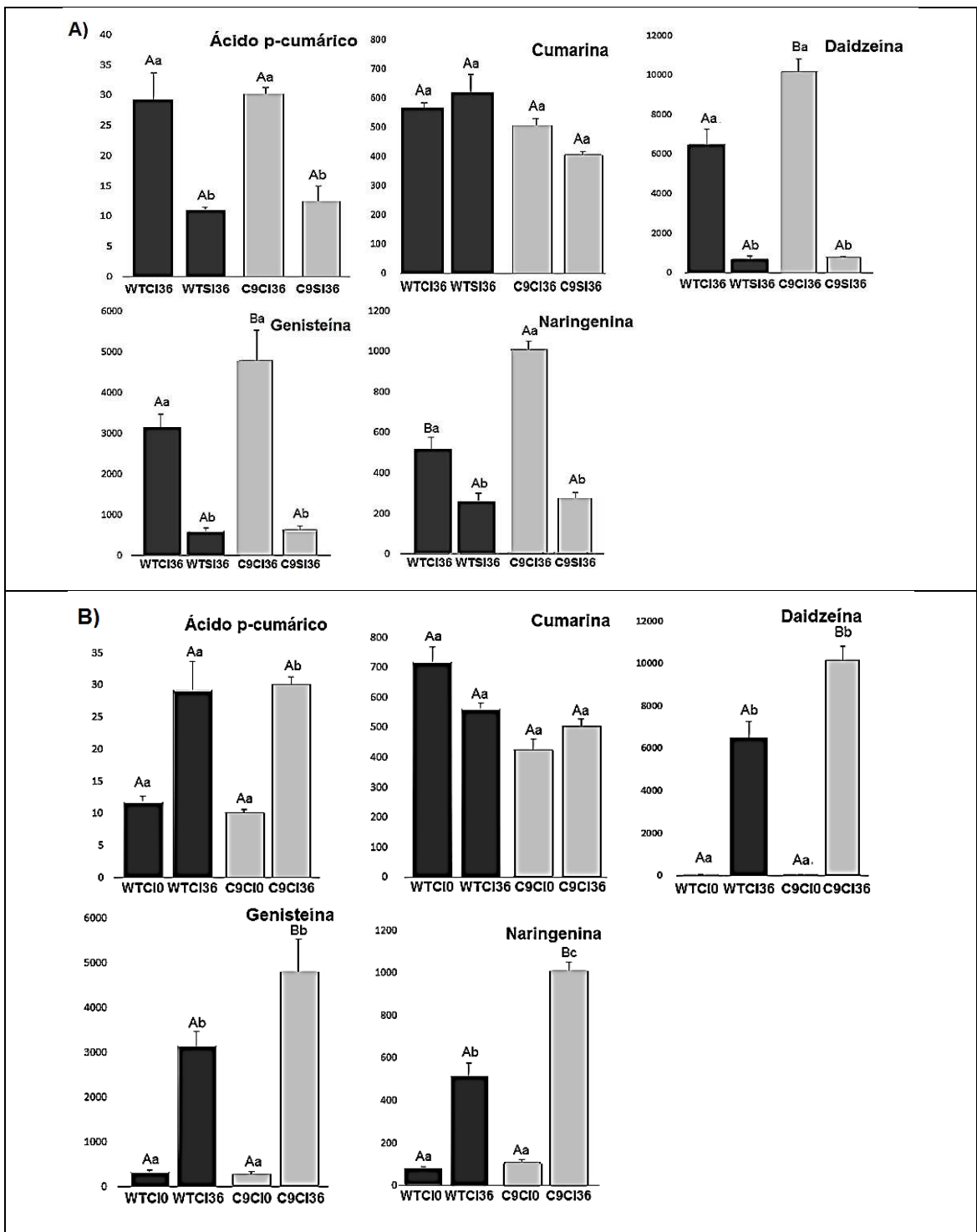


Figura 15. Quantificação de metabólitos secundários (ng/g) em amostras de soja A) com e sem infecção em 36 hpi e B) resposta temporal à inoculação com *P. s. pv. tomato*. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=4). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras maiúsculas correspondem aos genótipos e minúsculas aos tratamentos (com e sem infecção).

Para o ácido *p*-cumárico obteve-se em plantas C9 um acréscimo de 2,5 vezes nas concentrações em plantas CI, resultado similar em plantas WT CI, comparadas com SI em 36 hpi. A daidzeína foi o composto que sofreu o maior incremento significativo ao se comparar plantas CI e SI, de 13,4 vezes em variedades C9 e de 9,4 vezes em variedades WT, ambas no tempo 36 hpi. Sob as mesmas condições, a naringenina aumentou 3,7 vezes em plantas C9 e 2,0 vezes em plantas WT, enquanto a genisteína sofreu uma elevação de 5 vezes em plantas WT e aproximadamente 7,5 vezes em plantas C9. As análises de metabólitos secundários permitiram a observação de um aumento nítido nos níveis em plantas submetidas à infecção bacteriana ao se compararem os tempos zero e 36 hpi, sobretudo em compostos da família das isoflavonas.

Ao tempo zero, todos estiveram presentes em níveis análogos, tanto em plantas C9 quanto em plantas WT, ao passo que, em 36 hpi, os isoflavonoides apresentaram um aumento maior em plantas C9 em relação a plantas WT. No tempo 36 hpi, a concentração de naringenina foi significativamente alterada em plantas C9 em relação a plantas WT, sofrendo um aumento de 2 vezes, enquanto a genisteína teve um acréscimo significativo de 50%. Enquanto isso, a concentração de daidzeína também apresentou uma elevação significativa de 1,5 vezes em plantas C9 em comparação com plantas WT submetidas à infecção.

As isoflavonas foram os compostos que apresentaram o incremento mais significativo em resposta à inoculação com *Pseudomonas*. A concentração de daidzeína chegou a aumentar 176 vezes em plantas C9 e 98 vezes em plantas WT ao se compararem os tempos zero e 36 hpi. Além disso, nos níveis de genisteína se constatou um aumento de 16,6 vezes em variedades C9 e de 9,2 vezes em variedades WT. No caso da naringenina, 9 vezes em plantas C9 e 6,3 vezes em plantas WT. O ácido *p*-cumárico, com a inoculação com *Pseudomonas*, apresentou uma elevação de 3 vezes para plantas C9 e 2,5 vezes para plantas WT entre zero e 36 hpi, enquanto a cumarina não demonstrou variação significativa ao longo do tempo.

6. DISCUSSÃO

6.1. Análise dos sintomas em folhas de soja

Estudos com plantas de soja superexpressando o gene *soyBiPD* mostraram que a sua superexpressão confere tolerância à seca em plantas transgênicas de soja (VALENTE *et al.*, 2009) e o mecanismo de tolerância envolve morte celular (REIS *et al.*, 2011). Apesar dos sintomas não estarem visíveis em 8 hpi, a inoculação de *P. s. pv. tomato* em folhas de soja, como esperado, provocou uma rápida resposta fenotípica de PCD, aparentemente visível após cerca de 15 hpi, se consolidando após 36 hpi, momento em que se realizou a terceira coleta para análise. Em contrapartida, o controle (SI, plantas infiltradas com $MgCl_2$) não apresentou resposta visível. Em um estudo anterior a respeito da infiltração de *P. s. pv. tomato* em folhas de soja (CARVALHO *et al.*, 2014), as lesões necróticas em plantas transgênicas também foram mais severas quando comparadas com o tipo selvagem. Ambos os genótipos não apresentaram sintomas de HR em plantas infiltradas com $MgCl_2$. Os sintomas fenotipicamente visíveis de PCD em plantas superexpressando BiP foram aparentes em 12 hpi.

Apesar de ter sido utilizado um método de inoculação distinto no presente trabalho, foi observado sintomas foliares de acordo com os observados por CARVALHO e colaboradores (2014). Todavia, os sintomas foram mais tênues no presente estudo, possivelmente devido ao trabalho anterior ter injetado mais bactérias em uma determinada área, uma vez que a infiltração foi realizada manualmente, rompendo a cutícula e forçando a entrada de uma concentração maior de bactérias para o interior das folhas. Neste trabalho, procurou-se realizar uma infiltração homogênea em todo o tecido foliar.

Foram visualizadas as respostas da via de HR nos dois genótipos de soja quando elicitadas pela presença do fitopatógeno incompatível *P. s. pv. tomato*. Conforme a Figura 4, ocorreu HR e a formação de halos de necrose no local da infecção maiores em plantas transgênicas superexpressando BiP. Como a solução inoculada para ambos os cultivares continha a mesma densidade óptica de *P. s. pv. tomato*, isto indica uma proliferação maior da

bactéria no tecido vegetal antes de ser contida pelo mecanismo de PCD, evidenciando que a defesa vegetal respondeu de maneira tardia no genótipo C9. Corrobora para isto as imagens de folhas de soja infectadas em 15 e 30 dpi, onde o mecanismo de PCD ligado à HR se torna mais evidente que em plantas não infectadas.

6.2. Perfil de agrupamento dos tratamentos

A análise de gráficos de *score plot* tridimensional (Figura 7) demonstra uma total randomização nos componentes no tempo 8 hpi (Figura 7B), em comparação com o tempo zero (Figura 7A), ao passo que o tempo 36 hpi (Figura 7C) apresenta uma certa organização dos componentes e separação das variedades e dos tratamentos de modo distinto da apresentada no tempo zero. Perante isto, pode-se concluir que ambas as variedades apresentaram respostas metabólicas distintas no tempo zero e 36 hpi, diante da inoculação de *P. s. pv. tomato* e das diferenças entre os perfis apresentados.

Os gráficos de caixa e os resultados de *score plot* bidimensional para plantas com inoculação (Figura 8 e Figura 9) indicaram que ambos os cultivares não apresentaram alterações metabólicas entre zero e 8 hpi, porém alguns processos bioquímicos de resposta para os dois genótipos sofreram perturbações similares no metabolismo em 36 hpi quando comparado a zero e 8 hpi, tendo em vista a separação significativa entre as áreas. O ajuste metabólico em ambos os genótipos em resposta à inoculação bacteriana foi proporcional, conforme o resultado do PLS-DA bidimensional, porém, o genótipo WT apresentou valores de concentração relativa dos metabólitos aferidos superiores quando comparados a C9, como se pode observar nos gráficos de caixa. Isto está de acordo com CARVALHO e colaboradores (2014), segundo o qual a superexpressão de BiP parece promover alterações em genes ligados a processos catabólicos e de morte celular, quando submetidos a formas de estresses.

6.3. Metabolismo primário

O aumento da concentração relativa de açúcares e derivados (açúcares álcoois, como o manitol, e açúcares ácidos, como o ácido eritrônico, treônico, glucônico e glucoeptônico), no tecido foliar pode estar relacionado à necessidade de proteger as células danificadas pelos micro-organismos, como no caso da isomaltose, um dissacarídeo formado por resíduos de glicose, que aumentou mais de 4,6 vezes em plantas C9 (Tabela S2), possivelmente para reforçar a parede celular em vista de uma maior colonização do tecido foliar por bactérias. À medida que o vegetal passa por condições de estresse, este responde induzindo a mobilização de nutrientes, como aminoácidos, sacarídeos e lipídeos, de forma a garantir o suprimento de energia e proteção em condições de estresse. Outros açúcares, como xilose e arbutina, que tiveram no *fold change* um nítido aumento ao longo do tempo após a inoculação, atuam na formação de barreiras estruturais ou como agentes antioxidantes, impedindo que as ROS formadas pelo ataque microbiano danifiquem as células vegetais (ECMDB, 2017; MANDAL *et al.*, 2010).

Inúmeras possibilidades podem ser levantadas para explicar o acúmulo de aminoácidos, como alanina, isoleucina, leucina e valina, em condições de estresse, podendo indicar a realocação para outras vias por serem intermediários no suprimento de energia ou defesa vegetal (ROJAS, 2014), por estar relacionado com fenômenos de morte celular como biossíntese de aminoácidos ou reforço da parede celular, uma vez que estes aminoácidos são hidrofóbicos. Os dados de FC revelaram que os BCAA, entre zero e 36 hpi, aumentaram cerca de duas vezes em plantas C9 e mais de 1,5 vezes em plantas WT, ao passo que não houve alteração significativa em plantas 36 hpi CI e SI. Isto sugere que o aumento de tais aminoácidos não está relacionado com a infecção bacteriana e com a HR em si, mas com o dano sofrido pelo estresse abiótico da inoculação. Interessante ressaltar o acúmulo de leucina, isoleucina e valina, de natureza hidrofóbica. Estudos sugerem a participação direta destes aminoácidos no controle dos danos provocados por estresses bióticos, seja pela biossíntese de metabólitos secundários, como os glicosinolatos, seja pela síntese de proteínas ricas em BCAA como agentes participantes dos eventos de senescência e morte celular programada

(MIKKELSEN & HALKIER, 2003; CHOI *et al.*, 2011). O aumento da concentração relativa destes compostos indica, portanto, uma resposta adaptativa ao estresse biótico pela ativação de mecanismos de defesa vegetal, morte celular e homeostase.

Uma explicação plausível para o aumento dos níveis de aminoácidos em ambos os tratamentos está na elevação do nível de estresse provocado na planta, seja pela infecção com *P. s. pv. tomato*, seja pelo processo de descompressão e entrada de solução de $MgCl_2$ nos estômatos. O estudo indicou uma maior sensibilidade na resposta a ambos os processos, isto é, parece responder tanto ao estresse biológico quanto ao estresse mecânico. Os níveis dos aminoácidos citados, contudo, sofreram uma maior elevação em plantas infectadas. Outros aminoácidos são precursores no metabolismo de hormônios e metabólitos secundários e se pode aferir sua presença, como a fenilalanina (flavonoides, fenolatos e benzoatos) e o triptofano (auxinas).

O GABA (γ -aminobutirato), aminoácido não proteico, é sintetizado a partir da descarboxilação do glutamato. O seu incremento, juntamente com o seu isômero AABA (α -aminobutirato), está relacionado com o pH celular, uma vez que a glutamato descarboxilase (GAD), que catalisa a formação de GABA e é ativada em condições de elevação dos níveis de H^+ ou Ca^{2+} (RAMPUTH & BOWN, 1996). Estudos indicam que os danos celulares provocados por diversas formas de estresses levam ao rompimento dos vacúolos, reservatórios de ácidos orgânicos importantes para o metabolismo e com pH mais ácido (GALSTON *et al.*, 1980). Esta ruptura levaria a acidificação do citosol e produção de GABA. Outro fator que deve ser levado em consideração são os níveis de Ca^{2+} citosólico, que se elevam em resposta a diversos tipos de estresse. Este íon atua formando complexos com a calmodulina e, juntos, ativam a GAD e a síntese de GABA (SANDERS *et al.*, 1999). A ligação pode estar na relação entre a elevação nos níveis dos íons Ca^{2+} , de GABA e na ativação dos eventos de defesa vegetal. Portanto, em plantas transgênicas superexpressando BiP, os baixos níveis de GABA, assim como DHS, estão de acordo com os sinais de atraso na manifestação da morte celular.

Uma interpretação a ser considerada relaciona os níveis de succinato e fumarato com a aminação do α -cetoglutarato, seu precursor imediato no ciclo

do ácido cítrico, e a formação de glutamato, este, por sua vez, precursor do GABA. Portanto, conforme se vê no *vip score* de plantas CI (Figura 13), pode existir uma relação entre os níveis de fumarato, succinato e GABA.

É importante ressaltar o papel do malonato, que atua como inibidor da respiração celular, competindo com o succinato pelo sítio ativo da succinato desidrogenase no ciclo do ácido tricarboxílico e no complexo II da fosforilação oxidativa, impedindo a formação de fumarato (DERVARTANIAN & VEEGER, 1964), como se pode ver nos indicadores de concentração relativa do *vip score* em plantas inoculadas com *Pseudomonas* (Figura 13). No *vip score* em 36 hpi (Figura 12), vê-se uma diminuição nos níveis relativos de malonato e succinato e um aumento nos níveis de fumarato. Devem-se levar em conta, ainda, as vias de reposição de fumarato e succinato, compostos que participam da respiração celular e importantes vias de síntese.

Esfingolípídeos pertencem a um grupo de lipídeos que são componentes essenciais das membranas celulares, dentre os quais se destaca as esfingosinas. Estudos recentes têm demonstrado que, em plantas, esfingolípídios desencadeiam o processo de PCD por meio da formação de ROS. Tem sido sugerido que as ROS, ao lado de Ca^{2+} , exercem um papel importante no controle da PCD induzida por esfingolípídeos (PATA *et al.*, 2010).

Estudos com a aplicação de DHS em tabaco resultou no incremento na concentração de Ca^{2+} citosólico, relacionado com a produção de ROS e posterior ativação da defesa vegetal, e Ca^{2+} nuclear, que desencadeia a via de PCD. Assim, pode-se propor uma teoria do envolvimento do cálcio e ROS na via de sinalização induzida por DHS na PCD e defesa vegetal (LACHAUD *et al.*, 2010).

Os resultados sugerem que tais compostos (açúcares, DHS, GABA) desencadeiam uma série de eventos que levam à ativação de dois mecanismos de defesa vegetal: a síntese de compostos de ação antimicrobiana e a ativação da via de sinalização de PCD. Assim, os resultados indicam que as perturbações no metabolismo dos esfingolípídeos, provavelmente o acúmulo de ácidos graxos, ceramidas e DHS, induzem a PCD

e/ou o sistema de defesa vegetal em plantas, embora o modo exato de como estes compostos desencadeiam as reações não esteja esclarecido (ROJAS *et al.*, 2014).

O aumento dos níveis de palmitoleato e de estearato pode indicar a ativação dos mecanismos de defesa vegetal pela via de síntese de ácidos graxos. O palmitato é um precursor dos ácidos graxos e das ceramidas, como a DHS, e o estearato, precursor dos derivados do ácido eicosanoico e, como o ácido jasmônico, indicam a ativação das vias de síntese.

Tanto genes relacionados com a síntese de esfingolipídeos quanto de ácidos graxos aumentam sua atividade na presença de patógenos avirulentos. Estudos indicam que as atividades de SPT (serina-palmitoil transferases), enzima importante na síntese de esfingosinas, provavelmente induz respostas de defesa, como a síntese de proteínas-PR e de ROS, sendo que enzimas que atuam no alongamento e dessaturação de ácidos graxos podem estar ligadas com a formação de peróxidos (YAENO *et al.*, 2004).

Alguns compostos que se destacaram nas análises de ANOVA, *vip score* ou *fold change* são de origem possivelmente bacteriana. Interessante ressaltar, como exemplo, o ácido lactobiônico (ácido galacto-glucônico), que aumentou cerca de seis vezes na análise de FC para WTCl36/WTSI36; porém, possui origem possivelmente bacteriana, uma vez que este ácido, obtido da oxidação parcial da lactose, ainda não foi detectado em vegetais e é produzido por *Pseudomonas* (ALONSO *et al.*, 2012). Tais compostos são importantes na ativação de respostas de defesa porque atuam como marcadores moleculares específicos para o reconhecimento de micro-organismos patogênicos ou não, denominados PAMPs ou padrões moleculares associados a micro-organismos (MAMPs, do inglês *microbe associated molecular patterns*). Muitos destes compostos são reconhecidos por oligossacarídeos das células foliares, desencadeando a sinalização que resulta em uma resposta defensiva, como a formação de ROS (ALLÈGRE *et al.*, 2009). Um composto merece destaque. A análise de *fold change* reportou uma elevação de N-butanoil-homoserina lactona [2,0 vezes em plantas WT Cl de zero a 36 h (Tabela S3) e 1,4 vezes em plantas C9 Cl de zero a 36 h (Tabela S4)]. As N-acil-homoserina lactonas são moléculas sinalizadoras bacterianas atuantes no fenômeno de percepção

de quórum (*quorum sensing*), que permite a coordenação do comportamento de micro-organismos em relação ao meio ambiente em meio ao próprio crescimento populacional (AREVALO-FERRO *et al.*, 2003; CATALDI *et al.*, 2007). O aumento da concentração relativa desta molécula em plantas WT indica, possivelmente, um aumento da densidade populacional bacteriana devido à contenção dos micro-organismos em uma menor área devido ao êxito do mecanismo de morte celular em menor tempo que em plantas C9.

Assim, não se pode afirmar a origem indubitável dos compostos ou os acréscimos ou reduções de compostos presentes nas duas espécies se originam do metabolismo vegetal e/ou bacteriano, sendo necessários estudos mais aprofundados a respeito.

6.4. Resposta fito-hormonal

A associação entre respostas de defesa vegetal à interação planta-bactéria e a expressão de genes ligados à síntese e distribuição de hormônios e metabólitos secundários é inegável, uma vez que estes respondem rapidamente às alterações ambientais, de acordo com a sua função metabólica.

Os níveis de ABA diminuiram ao longo do tempo pós-inoculação com o patógeno incompatível em ambos os genótipos, apresentado menores níveis no genótipo C9. O inverso se deu com SA e JA, cujas concentrações foram maiores em C9 que em WT, e os níveis maiores em plantas 36 hpi que no tempo zero.

Em soja, estudos demonstraram o efeito protagonista do ABA nos estresses abióticos como a seca (DAIE & CAMPBELL, 1981). Evidências sugerem que ABA afeta essencialmente de modo negativo a resistência a patógenos, interferindo em diferentes níveis com a sinalização do estresse biótico. Tem se tornado claro o controle do ABA na rede de sinalização abiótica enquanto a rede de estresse biótico é controlada por SA, JA e etileno, e ambas são interconectadas em vários níveis (MAUCH-MANI & MAUCH, 2005; Figura 16). As potenciais conexões entre a rede de sinalização mediada por hormônios vegetais permanecem a serem esclarecidas.

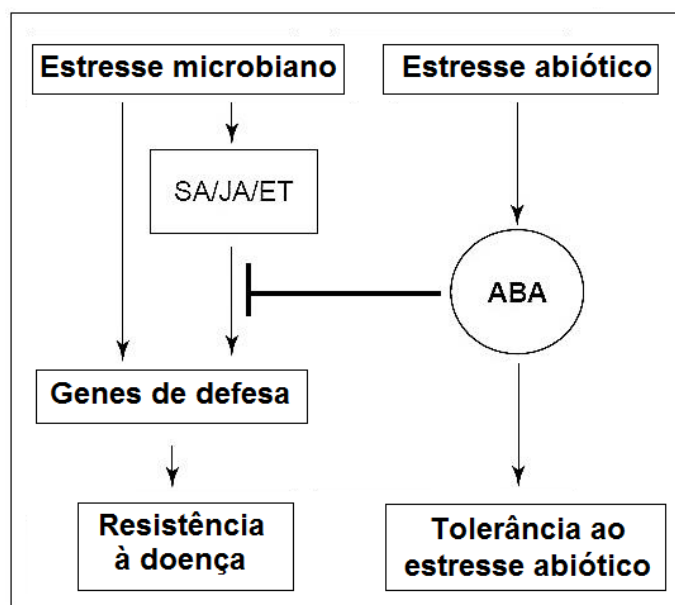


Figura 16. Representação simplificada do papel do ABA (ácido abscísico), SA (ácido salicílico), JA (ácido jasmônico) e ET (etileno) na resistência a patógenos. Fonte: MAUCH-MANI & MAUCH (2005)

A aplicação de ABA aumentou a susceptibilidade de folhas de tomate a *P. s. pv. tomato*, ao passo que em plantas transgênicas deficientes em ABA se mostraram mais resistentes e apresentaram resposta mediada por SA (THALER & BOSTOCK, 2004). Tais resultados sugerem um efeito antagonista do ABA na sinalização de defesa mediada por SA. Além disso, estudos mostraram que o tratamento com ABA suprimiu a síntese de fitoalexinas e inibiu a atividade e acúmulo, em soja, da fenilalanina amônia liase, enzima importante na síntese de SA, cumarinas e flavonoides (WARD *et al.*, 1989).

Deste modo, altas concentrações de ABA interferem na resistência a patógenos controlada pela via de sinalização do SA e na síntese de flavonoides (MAUCH-MANI & MAUCH, 2005). Portanto, pode-se relacionar uma tendência na diminuição dos níveis de ABA ao longo da infecção bacteriana com aumento da síntese de antimicrobianos, da via de sinalização do SA e o arrefecimento da susceptibilidade ao patógeno em plantas C9.

Outros dois hormônios importantes, o SA e o JA aumentaram em ambos os genótipos, sendo que os maiores níveis foram em C9 (Figura 15B). Estudos

relatam que a superexpressão de BiP estimula maiores níveis de SA em plantas transgênicas tanto em condições normais quanto de estresse (CARVALHO *et al.*, 2014), uma vez que o SA atua elevando ou regulando a atividade de enzimas de desintoxicação celular (AZOOZ & YOUSSEF, 2010). A resposta de defesa mediada por SA é ativada por infecção de patógenos biotróficos, que colonizam tecido foliar vivo, ao passo que o ataque de patógenos necrotróficos, que se propagam em tecido foliar morto, possuem mecanismos de defesa vegetal distintos e mediados por JA (ROBERTSEILANIANTZ *et al.*, 2011). A resposta de defesa dependente de SA exerce um importante papel em infecções ao limitar o crescimento de *P. syringae* (KLOEK *et al.*, 2001).

Importante destacar o aumento dos níveis de ácido jasmônico em plantas C9 CI ao longo do tempo em relação a plantas WT. O JA, derivado da via dos eicosanoides atua como indutor de senescência em várias espécies de plantas, aumentando a respiração e proteólise (WEIDHASE *et al.*, 1987). A tendência de níveis maiores de SA e JA em ambos os genótipos ao longo do tempo podem indicar a presença de componentes da sinalização de defesa contra patógenos em folhas de soja mediada tanto por JA quanto por SA. O aumento momentâneo de JA também pode ocorrer devido a regulação negativa na resposta de PDC devido à atuação de BiP superexpresso, conservando a homeostase celular por um período de tempo maior. A propagação sem controle do patógeno incompatível devido ao atraso na ativação da via de PCD levaria a um aumento dos níveis de SA e JA para o controle de micro-organismos tanto em áreas de tecido vivo quanto de tecido necrosado.

Este perfil de resposta hormonal em plantas C9 (níveis mais baixos de ABA e mais elevados de SA e de JA) está de acordo com a observação que a superexpressão de BiP atrasa a via de PCD no genótipo transgênico, ao passo que no genótipo selvagem, a via de PCD atua na eficaz contenção do micro-organismo.

Dos hormônios monitorados, as auxinas (como o ácido indolacético) apresentaram o maior incremento significativo, aumentando significativamente em plantas WT e C9 infectadas em 36 hpi. O aumento de AIA pode estar

relacionado com a resposta da soja à interação com *P. s. pv. tomato* em vista das alterações ambientais que podem prejudicar a capacidade reprodutiva da planta em longo prazo ou até mesmo levá-la a morte. Importante ressaltar que a elevação de AIA pode interferir na transcrição de genes relacionados com estresse biótico (por exemplo, na síntese de enzimas da via dos flavonoides), dado que as auxinas estimulam a degradação de proteínas repressoras e interferem na transcrição gênica (ALBERTS, 2014).

A função das citocininas, como a zeatina, está relacionada com divisão celular, inibição da dominância apical e floração. Os resultados indicaram uma elevação significativa para ambos os genótipos e ambos os estresses em 36 hpi, indicando uma resposta tanto ao estresse biótico quanto ao estresse mecânico. Portanto, o aumento nos níveis pode ser uma resposta ao dano sofrido pela entrada de solução de $MgCl_2$ nos estômatos e não à bactéria, estimulando a divisão celular, a formação de novas gemas e a ramificação lateral.

6.5. Metabolismo secundário

O *fold change* do GC-MS e os resultados de LC-MS indicaram diminuição de fenilpropanoides [ácido 3(*orto*-hidroxifenil)-propanoico] e síntese de compostos fenólicos (arbutina), benzoatos (ácido salicílico), cumarinas e flavonoides. Flavonoides são polifenóis que possuem em comum três anéis condensados na estrutura química C6-C3-C6, podendo ser divididos em flavanonas (como a naringenina), flavonas, isoflavonas (como a daidzeína e a genisteína), di-hidroflavanóis, flavanóis e antocianinas. São sintetizados a partir da fenilalanina pela via do ácido chiquímico e estão distribuídos em diferentes concentrações de acordo com a espécie, tecido, estágio de desenvolvimento e condições de estresse (MATHEWS *et al.*, 2003). Tal via requer concentrações equimolares de fosfoenolpiruvato (PEP), formada pela via glicolítica, e eritrose-P-fosfato, formada na via das pentoses-fosfato. O estresse induzido impede a ação de vias anapleróticas, como o ciclo de Krebs e a via das pentoses-fosfato, o que pode explicar a diminuição de alguns compostos em plantas C9 em 36 hpi, como succinato e fumarato (Figura 12 e Figura 13; Tabela S2 e Tabela

S4). Uma evidência possível desta ligação seria o aumento nos níveis de eritrose (Figura 6) e precursores do PEP (como glicose; Figura 12) observados em plantas inoculadas em 36 hpi.

Muitos estudos são realizados tentando desvendar os processos de produção, transporte e acúmulo de flavonoides. Estudos indicam o aumento na expressão de genes de biossíntese e transporte induzido por diversos fatores em tomate e *Arabidopsis* (MATHEWS *et al.*, 2003; DEBEAUJON *et al.*, 2001). Os flavonoides, em plantas leguminosas, exercem o papel de fitoalexinas, sendo tóxicos a uma ampla gama de micro-organismos e seu acúmulo restringe o crescimento e a colonização nos tecidos vegetais. Consequentemente, o aumento dos níveis destas substâncias está relacionado com a infecção por *Pseudomonas* e possivelmente na minimização dos danos provocados pelas ROS.

Dos metabólitos secundários monitorados, a daidzeína foi o mais expressivo, seguida da genisteína, apresentando elevações significativas em plantas C9 Cl. Sabe-se que estes compostos possuem um amplo grupo de funções, como atividade antioxidante, proteção contra a radiação UV e defesa contra fitopatógenos. A naringenina apresentou, em plantas WT infectadas, níveis elevados em 8 hpi em relação ao tempo zero e níveis estáveis em 36 hpi em comparação com 8 hpi, enquanto plantas C9 apresentaram níveis crescentes, maiores em 36 hpi que em plantas WT em 36 hpi. Sendo uma flavanona, a naringenina é precursora de isoflavonas, como daidzeína e genisteína, dentre outros compostos flavonoides. A concentração de cumarina e ácido *p*-cumárico, também precursores dos flavonoides, apresentaram alterações em suas concentrações. Isto pode indicar que o atraso na ativação de mecanismos de PCD provocado pela superexpressão de BiP em plantas transgênicas de soja estimulou a formação de compostos antimicrobianos, como as isoflavonas, mais rapidamente que em variedades selvagens, ao passo que a PCD demonstrou eficácia na contenção da propagação bacteriana em plantas selvagens, levando a uma menor produção de flavonoides.

Embora envolvidos na resposta da planta ao ataque de micro-organismos, a via de PCD e a produção de substâncias com propriedades antimicrobianas não são mecanismos concorrentes, porém complementares,

ocorrendo ao mesmo tempo em situações reais de estresse. Já o predomínio de um ou de outro depende da capacidade efetiva deste em conter a colonização microbiana o mais rápido possível, isto é, a via mais apta predominará. Importante ressaltar que BiP funciona como um regulador negativo da via de PCD ativada pela seca ou por estresse osmótico (VALENTE *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2011), porém, a via de PCD possui grande importância na contenção de micro-organismos invasores como a *P. syringae* (ZOU *et al.*, 2005). Portanto, em plantas transgênicas superexpressando BiP, a morte celular induzida atenuada pode tornar predominante a síntese de compostos defensivos. De modo que somente o cruzamento de dados e uma análise combinada com outros metabólitos primários e secundários podem levar a entender os mecanismos que prevalecerão no estresse biótico (defesa ou morte celular).

7. CONCLUSÃO

A inibição da PCD devido à superexpressão de BiP em soja transgênica tem sido relacionada à tolerância ao estresse hídrico, entretanto estas plantas apresentaram um comportamento de menor capacidade em impedir a colonização bacteriana em tempo hábil, apresentando desta forma, sintomas inerentes mais evidentes.

Os resultados indicam que o mecanismo de superexpressão de BiP em plantas transgênicas de soja, ao inibir os eventos relacionados à morte celular, tornou a planta tolerante a estresses abióticos, como a seca, porém esta pode ser mais susceptível a estresses bióticos, quando em condições de infecção por bactéria incompatível.

Corroborando para esta proposição as alterações fenotípicas visíveis em folhas de soja transgênicas submetidas à inoculação com *P. s. pv. tomato*, com a presença de halos necrosados maiores e mais numerosos, e a diminuição da síntese de metabólitos primários relacionados à PCD, como di-hidroesfingosina e GABA, em plantas C9 em comparação a plantas WT.

Além disso, observou-se uma tendência para o aumento da produção de ácido salicílico e ácido jasmônico e menor produção de ácido abscísico em plantas C9 com infecção, quando comparadas com WT. A não contenção da propagação microbiana por meio da via da PCD em plantas C9 intensificou a via de síntese de metabólitos secundários com atuação antimicrobiana, como isoflavonas (genisteína e daidzeína) e flavanonas (naringenina), em concentrações maiores que em plantas WT, inibindo deste modo a propagação e a infecção bacteriana.

8. REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th ed. San Diego, Califórnia: Elsevier Academic Press, 922p. 2004.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 6th ed. Garland Science: New York and Abingdon, UK, 1464p, 2014;

ALLÈGRE, M.; HÉLOIR, M. C.; TROUVELOT, S.; DAIRE, X.; PUGIN, A.; WENDEHENNE, D. Are grape vine stomata involved in the elicitor-induced protection against downy mildew? **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, p. 977-986, 2009.

ALONSO, M. J.; ECKER, J. R. The ethylene pathway: a paradigm for plant hormone signaling and interaction. **Science Signaling**, v. 70, p. 1-10, 2007.

ALONSO S.; RENDUELES M.; DÍAZ M. Physiological heterogeneity of *Pseudomonas taetrolens* during lactobionic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1465-77, 2012.

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

AREVALO-FERRO, C.; HENTZER,, M.; REIL, G.; KJELLEBERG, S.; GIVSKOV, M.; RIEDAL, K.; EBERL, L. Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. **Environmental Microbiology**. Oxford, v. 12, p. 1350-1369. Set. 2003.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; FERREIRA, P. T.; CAVALCANTI, L. S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; VILELA DE RESENDE, M. L.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, v. 13, p. 51-80, 2005.

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

BALTRUS, D.; NISHIMURA, M.; DOUGHERTY, K.; BISWAS, S.; MUKHTAR, M. S.; VICENTE, J.; HOLUB, E.; JEFFERY, D. The molecular basis of host specialization in bean pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 7, p. 877-888, 2012.

BENNETT, J. M.; HICKS, D. R.; NAEVE, S. L.; BENNETT, N. B. The Minnesota soybean field book. St Paul, MN: University of Minnesota Extension, p. 84, 2014. Disponível em: <http://www.extension.umn.edu/agriculture/soybean/docs/minnesota-soybean-field-book.pdf>. Acesso em: 17 set. 2016.

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

BRASIL. Lei n. 11.105, de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização que envolvem organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional De Biossegurança – CTNBio, dispõe sobre a Política Nacional De Biossegurança – PNB, revoga a Lei n. 8,974, de 5 de janeiro de 1994, e a Medida Provisória n. 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10 e 16 da Lei n. 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.com.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/lei/L11105.htm. Acesso em: 17 set. 2016.

CARDOSO FILHO, J. A. Efeito de extratos de albedo de laranja (*Citrus sinensis*) e dos indutores de resistência ácido salicílico, acilbenzolar-s-metil e *Saccharomyces cerevisiae* no controle de *Phyllosticta citricarpa* (Telemorfo: *Guignardia citricarpa*). 2003. 145p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2003.

CARVALHO, H. H. Função do chaperone BiP em eventos de morte celular programada em plantas. 2013. 108p. Dissertação (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2013

CARVALHO, H. H.; SILVA, P. A.; MENDES, G. C.; BRUSTOLINI, O. J. B.; PIMENTA, M. R.; GOUVEIA, B. C.; VALENTE, M. A. S.; RAMOS, H. J. O.; SOARES-RAMOS, J. R. L.; FONTES, E. P. B. The endoplasmic reticulum binding protein bip displays dual function in modulating cell death events. **Plant Physiology**, v. 164, p. 654-670, 2014.

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

CATALDI, T. R.; BIANCO, G.; PALLAZZO, L.; QUARANTA, V. Occurrence of N-acyl-L-homoserinelactones in extracts of some gram negative bacteria evaluated by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical biochemistry**, v. 361, p. 226-235, 2007.

CATTIVELLI, L.; RIZZA, F.; BADECK, F.W.; MAZZUCOTELLI, E. A.; MASTRANGELO, M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, v. 105, p. 1-14. 2008.

CHESTER, K. S. The problem of acquired physiological immunity in plants. **Quarterly Reviews Biophysics**, v. 8, p. 275-324, 1933.

CHOI, H. W.; KIM, Y. J.; HWANG, B. K. The hypersensitive induced reaction and leucine-rich repeat proteins regulate plant cell death associated with disease and plant immunity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 1, p. 68-78, 2011.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Perspectivas para a agropecuária: Volume 2 – Safra 2014/2015. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_10_18_03_00_perspectivas_2014-15.pdf. Acesso em: 21 out. 2016.

CORDEIRO, M. C. R.; SÁ, M. F. G. Biotecnologia e resistência a patógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 2, n. 10, p. 34-39, 1999.

CRAMER, G. R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**, v.11, p. 163, 2011.

CUADROS-INOSTROZA, A.; CALDANA, C.; REDESTIG, H.; KUSANO, M.; LISEC, J.; PEÑA-CORTÉS, H.; WILLMITZER, L.; HANNAH, M. A. TargetSearch – a bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics**, v.10, p. 428-435, 2009.

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

DEBEAUJON, I.; PEETERS, A. J. M.; LEON-KLOOSTERZIEL, K. M.; KOORNNEEF, M. The *TRANSPARENT TESTA12* gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. **Plant Cell**, v. 13, p. 853-871, 2001.

DELANEY, T. P.; UKNES, S.; VERNOOIJ, B.; FRIEDRICH, L.; WEYMANN, K.; NEGROTTO, D.; GAFFNEY, T.; GUTRELLA, M.; KESSMANN, H.; WARD, E.; RYALS, J. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. **Science**, v. 266, p. 1247-1250, 1994.

DERVARTANIAN, D. V.; VEEGER, C. Studies on succinate dehydrogenase. I. Spectral properties of the purified enzyme and formation of enzyme-competitive inhibitor complexes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 92, p. 233-247, 1964.

DURNER, J.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 266-274, 1997.

ECKER, J. R. The ethylene signal transduction pathway in plants. **Science**, v. 268, p. 667-675, 1995.

ECMDB. Lyxose. Disponível em: <http://ecmdb.ca/compounds/M2MDB000608>. Acesso em: 5 mai. 2017

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. História da soja. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/historia>. **Embrapa Soja**. Acesso em: 11 out. 2016.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Soja em números (safra 2016/2017). **Embrapa Soja**. Disponível em <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos> (Atualizado em Junho de 2017). Acesso em: 14 jul. 2017

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

FIGUEIREDO, J. E. F.; CASCARDO, J. C. M.; CAROLINO, S. M. B.; ALVIM, F.; FONTES, E. P. B. Water-stress regulation and molecular analysis of the soybean BiP gene family. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 9, p. 103-110, 1997.

FINKEL, T. Redox-dependent signal transduction. **FEBS Letters**, v. 476, p. 52-54, 2000.

FLOR, H. H. The complementary genic systems in flax and flax rust. **Advances in Genetics**, v. 8, p. 29-54, 1956.

GALSTON, A. W.; DAVIES, P. J.; SATTER, R. L. **In: The Life of the Green Plant**, 3rd ed. p. 45. Prentice Hall, Inc. Englewood, New Jersey, EUA. 1980.

GARDAN, L.; SHAFIK, H.; BELOUIN, S.; BROCH, R.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, 469-478, 1999

GHOSHROY, S.; LARTEY, R.; SHENG, J. S.; CITOVSKY, V. Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 25-48, 1997.

GRANDE ENCICLOPÉDIA LAROUSSE CULTURAL. Pseudomonas. In: _____ . São Paulo: Nova Cultural, v. 20, p. 4818, 1998.

GRANDE ENCICLOPÉDIA LAROUSSE CULTURAL. Soja. In: _____ . São Paulo: Nova Cultural, v. 22, p. 5442, 1998.

GUZZO, S. D. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*. 2004. 256p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2004.

HAMMOND, C.; HELENIUS, A. Quality control in the secretory pathway. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, p. 523-529. 1995.

HETHERINGTON, A. M.; WOODWARD, F. I. The role of stomata in sensing and driving environmental change. **Nature**, v. 424, p. 901-908, 2003.

HIRAKURI, M. H. Impacto da estiagem na produção de soja no estado do Paraná, safra 2008/09. Disponível em: ,, ,, ,, ,, ,, ,, ,, ,, . Acesso em 2 jul. 2017.

ICHINOSE, Y.; TAGUCHI, F.; MUKAIHARA, T. Pathogenicity and virulence factors of *Pseudomonas syringae*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 79, p. 285-296, 2013.

JALEEL, C. A.; MANIVANNAN, P.; KISHOREKUMAR, A.; SANKAR, B.; GOPI, R.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, p. 150-157, 2007.

JELITTO-VAN DOOREN, E. P. W. M.; VIDAL, S.; DENECKE, J. Anticipating endoplasmic reticulum stress: a novel early response before pathogenesis-related gene induction. **Plant Cell**, v. 11, p. 1935-1943. 1999.

JWA, N. S.; KUMAR, G.; RAKWAL, R.; PARK, C. H.; PRASAD, V. Molecular cloning and characterization of a novel jasmonate inducible pathogenesis-

related class 10 protein gene, JIOsPR10, from rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 286, p. 973-983, 2001.

KAUFMAN, R. J.; SCHEUNER, D.; SCHRODER, M.; SHEN, X.; LEE, K.; LIU, C. Y. ARNOLD, S. M. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiations. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 411-421, 2002.

KESSMAN, H.; STAUB, T.; HOFFMAN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J.; WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 439-459, 1994.

KIMATA, Y.; KIMATA, Y. I.; SHIMIZU, Y.; ABE, H.; FARCASANU, I. C.; TAKEUCHI, M.; ROSE, M. D.; KOHNO, K. Genetic evidence for a role of BiP/Kar 2 that regulates Ire 1 in response to accumulation of unfolded protein. **Molecular Biology Cell**, v. 14 , p. 2559-2569, 2003.

KING, E.O.; WARD, M.K. & RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 44, p. 301-307, 1954.

KLOEK, A. P.; VERBSKY, M. L.; SHARMA, S. B.; SCHOELZ, J. E.; VOGEL, J. Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by na *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (coi1) mutation occurs through two distinct mechanisms. **Plant Journal**, v. 26, p. 509-522, 2001.

KODA, Y. The role of the jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. **International Review of Cytology**, v. 135, p. 155-199, 1992.

KOVALIC, R.; CAPELLE, T. Safra agrícola: série mostra os efeitos da maior colheita da história do país. *Jornal Hoje*. Disponível em: <http://g1.globo.com/jornal-hoje/noticia/2017/04/safra-agricola-serie-mostra-os-efeitos-da-maior-colheita-da-historia-do-pais.html>. Acesso em: 17 jul. 2017.

LACHAUD, C.; SILVA, D.; NICOLAS AMELOT, N.; BÉZIAT, C.; BRIÈRE, C.; VALÉRIE COTELLE, V.; GRAZIANA, A.; GRAT, S. CHRISTIAN MAZARS, C.; THULEAU, P. Dihydrosphingosine-induced programmed cell death in tobacco by-2 cells is independent of H₂O₂ production. **Molecular Plant**, v. 4, p. 310-318, 2011.

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

LEE, A. S. The ER chaperone and signaling regulator GRP/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. **Methods**, v. 35, p. 373-381, 2005.

KOORNNEEF, A.; PIETERSE, C. M. J. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiology*, v. 146, p. 839-844, 2008.

MA, Y.; HENDERSHOT, L. M. ER chaperone functions during normal and stress conditions. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 28, p. 51-65, 2004.

MANDAL, S. M.; CHAKRABORTY, D.; DEY, D. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. **Plant Signaling & Behavior** v. 5, n. 4, p. 359-368, 2010.

MATHEWS, H.; CLENDENNEN, S. K.; CALDWELL, C. G.; LIU, X. L.; CONNORS, K.; MATHEIS, N.; SCHUSTER, D. K.; MENASCO, D. J.; WAGONER, W.; LIGHTNER, J. Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. **Plant Cell**, v. 15, p. 1689-1703, 2003.

MAUCH-MANI, B.; MAUCH, F. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8 p. 409-414, 2005.

MIKKELSEN, M. D.; HALKIER, B. A. Metabolic engineering of valine- and isoleucine-derived glucosinolates in *Arabidopsis* expressing CYP79D2 from Cassava. **Plant Physiology**, v. 131: p. 773-779, 2003.

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

MORENO, A. A.; MUKHTAR, M. S.; BLANCO, F.; BOATWRIGHT, J. L.; MORENO, I.; JORDAN, M. R.; CHEN, Y.; BRANDIZZI, F.; DONG, X.; ORELLANA, A.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K. M. IRE1/bZIP60-mediated unfolded protein response plays distinct roles in plant immunity and abiotic stress responses. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, e31944, 2012.

MURATA, Y.; MORI, I.C.; MUNEMASA, S. Diverse stomatal signaling and the signal integration mechanism. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 369-392, 2015.

O'BRIEN, I. E. W.; BAGULEY, B. C.; MURRAY, B. G.; MORRIS, B. A. M.; FERGUSON, I. B. Early stages of the apoptotic pathway in plants are reversible. **The Plant Journal**, v. 13, n. 6, p. 803-814, 1998.

PALLAVAN-UNSAI N.; BUYUKTUNCER E.; TUFEKCI M. A. Programed cell death in plants. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 4, p. 9-23, 2005.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiros: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**, 3. ed. São Paulo: Ceres, v. 1, p. 417-453, 1995.

PATA, M. O.; HANNUN, Y. A.; NG, C. K. Y. Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. **New Phytology**, v. 185, p. 611-630, 2010.

PATIL, C.; WALTER, P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, p. 349-355, 2001.

PICOLI, E. A. T.; FIGUEIRA, M. L.; OTONI, W. C.; CAROLINO, S. M. B.; ALMEIDA, R. S.; SILVA, E. A. M.; CARVALHO, C. R.; FONTES, E. P. B. Hyperhydricity in vitro eggplant regenerated plants: structural characteristics

and involvement of BiP (Binding Protein). **Plant Science**, v. 160, p. 857-868, 2001.

PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M.; HOFFLAND, E.; VAN PELT, J. A.; VAN LOON, L. C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. **Plant Cell**, v. 8, p. 1225-37, 1996.

PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M.; VAN PELT, J. A.; KNOESTER, M.; LAAN, R.; GERRITS, N.; WEISBEEK, P. J.; VAN LOON, L. C. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 10, p. 1571-1580, 1998.

PILON, M.; SHECHEKMAN, R. Protein translocation: how Hsp 70 pulss it off. **The Cell**, v. 7, p. 679-682, 1999.

PRESTON, G. M. *Pseudomonas syringae* pv. tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time. **Molecular Plant Pathology**, v. 1, n. 5, p. 263-275, 2000.

RAMPUTH, A. I.; BOWN, A. W. Rapid γ -aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller larvae. **Plant Physiology**, v. 111, p. 1349-1352, 1996.

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

REIS, P. A.; FONTES, E. P. B. N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, p. 628-632, 2012.

ROBERT-SEILANIANTZ, A.; GRANT, M.; JONES, J. D. G. Hormone cross-talk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 317-343, 2011

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

ROJAS, C. M.; SENTHIL-KUMAR, M.; TZIN, V. MYSORE, K. S. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 17, p. 1-12, 2014.

ROSS, A. F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. **Virology**, v. 14, p. 340-358, 1961.

SANDERS, D.; BROWNLEE, C.; HARPER, J. F. Communicating with calcium. **The Plant Cell**, v. 11, p. 691-706, 1999.

SHELP, B. J.; BOWN, A. W.; AND MCLEAN, M. D. Metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. **Trends in Plant Science**, v. 41, p. 446-452, 1999.

SLATER, A.; SCOTT, N.; FOWLER, M. Plant disease resistance. In: **Plant biotechnology: The genetic inoculation of plants**. Oxford: New York. p. 157-178, 2003.

SOARES, F. M. P.; Métodos para detecção em sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e controle biológico de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. 1993. 41p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 1993.

SOBRAL, J. K. A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-panta. 2003. 174p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2003.

STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAUX, J. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235-270, 1997.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, p.1-30, 2000.

THALER, S. J.; BOSTOCK, R. M. Interactions between abscisic-acidmediated responses and plant resistance to pathogens and insects. **Ecology**, v. 85, p. 48-58, 2004.

TUBEROSA, R.; SALVI, S. Genomics approaches to improve drought tolerance in crops. **Trends in Plant Science**, v. 11 p. 405-412, 2006.

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

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

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.

VAN WEES, S. C. M.; PIETERSE, C. M. J.; TRIJSSENAAR, A.; VAN 'T WESTENDE, Y. A. M.; HARTOG, F.; VAN LOON, L. C. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, p. 716-24, 1997.

VINCENT, J. M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. **Blackwell Scientific Publishers**, Oxford, 164 p. 1970. (IBP Handbook, 15).

- VOELTZ, G. K.; ROLLS, M. M.; RAPOPORT, T. A. Structural organization of the endoplasmatic reticulum. **EMBO Reports**, v.3, n. 10, p.944-950, 2002.
- WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R.; SPADAFORA, A.; SENSI, E.; MAZZUCA, S.; CRESTI, M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2369-2375, 2003.
- WARD, E. W. B.; CAHILL, D. M.; BHATTACHARYYA, M. Abscisic acid suppression of phenylalanine ammonia lyase activity and mRNA, and resistance of soybeans to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. **Plant Physiology**, v. 91, p. 23-27, 1989.
- WEIDHASE, R. A.; KRAMELL, H. M.; LEHMANN, J. Methyl jasmonate induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf fragments. **Plant Science**, v. 51, n. 2/3, p. 177-186, 1987.
- YAENO, T.; MATSUDA, O.; IBA, K. Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. **Plant Journal**, v. 40, p. 931-941, 2004.
- YANJUN, M.; HENDERSHOT, L. M. ER chaperone functions during normal and estresse conditions. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 28, p. 51-65, 2004.
- YOUNG, J. M.; SADDLER, G. S.; TAKIKAWA, Y.; DE BOER, S. H.; VAUTERIN, L.; GARDAN, L.; GVOZDYAK, R. I.; STEAD, D.E. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. **Plant Pathology**, v. 75, p. 721-763, 1996.
- ZOU, J.; RODRIGUEZ-ZAS, S.; ALDEA, M.; LI, M.; ZHU, J.; GONZALEZ, D. O.; LILA O. VODKIN; DELUCIA, E.; CLOUGH S. J.; Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid hr-specific downregulation of photosynthesis. In: **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, n. 11, p. 1161-1174, 2005.

9. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Metabólitos responsivos referentes ao genótipo WT em 36 hpi em condições com e sem inoculação, obtidos por análise de *fold change*.

Nome	Fold Change	log₂(FC)
Arbutina (<i>p</i> -hidroxifenil- β -glicose)	39227,0	15,26
Malato	1355,0	10,404
5,6-Di-hidrotimina	15,396	3,9445
Ácido N-etilmaleâmico	7,4819	2,9034
Ácido lactobiônico	5,9347	2,5692
Lixose	5,1603	2,3674
α -Aminobutirato	3,169	1,664
Fumarato	2,208	1,1427
Ácido treônico	0,42362	-1,2392

Tabela S2. Metabólitos responsivos referentes ao genótipo C9 em 36 hpi em condições com e sem inoculação, obtidos por análise de *fold change*.

Nome	Fold Change	log₂(FC)
Ácido eritrônico-1,4-lactona	765,33	9,5799
Isomaltose	4,6057	2,2034
Arbutina (<i>p</i> -hidroxifenil- β -glicose)	3,4416	1,7831
Ácido lactobiônico	2,2508	1,1704
Ácido 3-hidroxi-3-metil-valérico	0,45438	-1,138
Ácido tartrônico	0,45115	-1,1483
Frutose-2,6-difosfato	0,41723	-1,2611
Fumarato	0,34108	-1,5518
Ácido 3(<i>orto</i> -hidroxifenil)-propanoico	0,17522	-2,5128
5,6-Di-hidrotimina	0,055711	-4,1659

Tabela S3. Metabólitos responsivos referentes ao genótipo WT com inoculação nos tempos zero e 36 hpi, obtidos por análise de *fold change*.

Nome	<i>Fold Change</i>	$\log_2(\text{FC})$
Lixose	3,60E+05	18,45648
Arbutina (<i>p</i> -hidroxifenil- β -glicose)	3,92E+04	15,25914
Malato	0,00136	10,40409
Ácido lactobiônico	0,441	5,462499
γ -Aminobutirato	4,38	2,131882
N-Butanoil-homoserina lactona	4,08	2,029559
Isomaltose	3,19	1,674015
Melezitose	3,12	1,64309
Leucina	3,11	1,638321
Isoleucina	2,99	1,579232
Valina	2,95	1,5629
α -Aminobutirato	2,49	1,315486
Galactinol	2,31	1,210763
<i>Myo</i> -inositol	2,27	1,180528
Ácido 15-Z-tetracosenoico	2,17	1,118445
N-Acetilgalactosamina	2,06	1,045223
Loganina	2,01	1,009582

Tabela S4. Metabólitos responsivos referentes ao genótipo C9 com inoculação nos tempos zero e 36 hpi, obtidos por análise de *fold change*.

Nome	Fold Change	log₂(FC)
Lixose	1,85E+05	17,49328
Arbutina (<i>p</i> -hidroxifenil- β -glicose)	2,35E+04	14,52218
Ácido lactobiônico	48,9	5,611121
Isomaltose	16,1	4,01196
γ -Aminobutirato	8,45	3,079234
Isoleucina	4,86	2,279494
Leucina	4,54	2,183572
Valina	3,82	1,934235
Galactinol	3,51	1,812992
Maltotriose	2,98	1,573853
myo-Inositol	2,73	1,447131
N-Butanoil-homoserina lactona	2,72	1,443831
β -Frutofuranosil-2,1- β -frutofuranose	2,62	1,388091
Melezitose	2,25	1,172864
Ribulose	2,22	1,149825
Ácido 15-Z-tetracosenoico	2,17	1,116786
N-Acetilmanosamina	2,12	1,084456
Ácido 2-metil-pentanodioico	2,06	1,042635
3-ortho-hidroxifenil-propanoico acid	4,69E-05	-14,3786
Ácido N-etilmaleâmico	4,00E-05	-14,6093
Fumarato	3,94E-05	-14,6328
Decanoato	3,05E-05	-15,0009
5,6-Di-hidrotimina	6,17E-05	-13,9833