

ROSILENE OLIVEIRA MESQUITA

**DETERMINANTES FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DA RESPOSTA
DIFERENCIAL À SECA EM SOJA**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

ROSILENE OLIVEIRA MESQUITA

**DETERMINANTES FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DA RESPOSTA
DIFERENCIAL À SECA EM SOJA**

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

APROVADA: 16 de abril de 2013.

Humberto Josué de Oliveira Ramos
(Coorientador)

Wagner Luiz Araújo

Luciano Gomes Fietto

Thomas Christopher Rhys Williams

Marcelo Ehlers Loureiro
(Orientador)

Aos meus pais pelo exemplo de vida,

À Deus pela proteção e bênçãos,

DEDICO E OFEREÇO

*“A mente que se abre a uma
nova idéia jamais voltará ao seu
tamanho original.”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Fisiologia Vegetal pela oportunidade da realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NUBIOMOL) por ter possibilitado a realização de parte deste trabalho e às agências financiadoras (FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos, CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e FAPEMIG - Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas) pelo financiamento dos aparelhos e da infraestrutura.

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

Ao Professor Marcelo Ehlers Loureiro pela confiança em mim depositada.

Ao Professor Humberto pelas sugestões, amizade, incentivo, disposição em ajudar e pelo exemplo de simplicidade.

Ao Professor Thomas por toda ajuda, comprometimento, amizade, simplicidade em transferir conhecimento e principalmente pelo exemplo de competência.

Aos Professores Luciano Gomes Fietto e Wagner Luiz Araújo por participar da banca e por enriquecer o trabalho com suas sugestões.

A todos os Professores do Programa de Fisiologia Vegetal desta instituição, pelos ensinamentos.

Ao Laboratório de Toxinologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), pelo uso de sua infraestrutura. Em especial ao Dr. Jonas Perales, Dr. Henk, Dr. Richard, Dr. André e Monique pela ajuda e colaboração.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Biologia Vegetal: Mercês, Carlos Raimundo, Antonio Cordeiro, Geraldo (Marreco), pelo apoio e convivência durante a realização deste trabalho.

Ao Edvaldo e à Nívea do NUBIOMOL pelo apoio, colaboração e amizade.

À Luciene pela disposição em ajudar na secretaria do Programa de Fisiologia Vegetal.

Aos amigos do laboratório: Camilo, Danilo, Eduardo, Viviane, Valdir, Alice, Ivan, Ana Carla, Giuliana, Fabiana, Daniela, Sabrina e tantos outros, pelos bons momentos e pela amizade.

Aos amigos do programa de Fisiologia Vegetal pelo companheirismo e amizade ao longo da minha estadia em Viçosa.

Aos amigos da Casa 21 pela cooperação, amizade, troca de informações e pela boa convivência, em especial aos amigos “Proteômicos”, Fernanda, Carla e Leandro, agradeço o apoio, ensinamentos e principalmente a amizade.

Aos amigos de Viçosa que vão deixar muitas saudades.

À sociedade brasileira, pela manutenção da universidade pública, gratuita e de excelência pela qualidade.

A Deus, que sempre me protegeu e me capacita a realizar tudo aquilo que acredito ser impossível e nunca me deixa desistir.

Enfim, a todos aqueles que estiveram do meu lado não só nas horas de sucesso e de alegria, mas que se esforçaram em me ajudar quando os problemas se fizeram presentes e os desafios se tornaram grandes demais para uma única pessoa. A todos devo minha gratidão e grande parte da felicidade que conquistei ao finalizar este trabalho.

BIOGRAFIA

ROSILENE OLIVEIRA MESQUITA, filha de Manuel Francisco Oliveira e Raimunda Lúcia de Mesquita Oliveira, nasceu em Fortaleza, CE no dia 23 de março de 1984. Em março de 2003 iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza, CE, graduando-se em dezembro de 2007. Ingressou, em março de 2008, no mestrado no Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, obtendo o título de *Magister Scientiae* em 18 de fevereiro de 2010. Em março de 2010, iniciou o curso de Doutorado em Fisiologia Vegetal na UFV, submetendo-se à defesa de tese no dia 16 de abril de 2013.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	6

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E PERFIL METABÓLICO DE GENÓTIPOS DE SOJA CONTRASTANTES PARA TOLERÂNCIA À SECA

1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1 Material vegetal e condução do experimento.....	11
2.2 Caracterização das respostas fisiológicas.....	12
2.2.1 Potencial hídrico foliar;	12
2.2.2 Trocas gasosas;	12
2.2.3 Parâmetros de fluorescência.....	12
2.2.4 Composição isotópica de ^{13}C	13
2.2.5 Determinação da peroxidação lipídica	13
2.2.6 Perfil metabólico	14
2.2.7 Teores de amido e açúcares	15
2.2.8 Quantificação do ácido abscísico	15
2.2.9 Efeito do estresse hídrico no crescimento e pigmentos cloroplastídicos	16
3. RESULTADOS.....	17
3.1 Potencial hídrico	17
3.2 Trocas gasosas e parâmetros de fluorescência da clorofila <i>a</i>	18
3.3 Danos celulares	31
3.4 Composição isotópica de ^{13}C	31

3.5 Açúcares e amido	32
3.6 Ácido abscísico (ABA).....	35
3.7 Comparação dos perfis metabólicos de folhas e raízes de cultivares tolerantes e sensíveis submetidas à seca	36
3.8 Efeito do estresse hídrico nos parâmetros de crescimento e pigmentos cloroplastídicos	18
4. DISCUSSÃO	43
5. CONCLUSÕES	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

CAPÍTULO 2

PROTEÔMICA DIFERENCIAL E FOSFOPROTEOMICA EM RAÍZES DE GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE SOJA EM DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS

1. INTRODUÇÃO	55
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1 Material vegetal e imposição do déficit	58
2.2 Análises do proteoma e fosfoproteoma diferencial	58
2.3 Extração de proteínas	58
2.4 Quantificação das proteínas	59
2.5 Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)	59
2.5.1 Focalização isoeletrica (IEF).....	59
2.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	60
2.5.3 Captura das imagens e análise da expressão	60
2.5.4 Tripsinização da amostra proteica	62
2.5.5 Espectrometria de massa	63
2.5.6 Identificação de proteínas por espectrometria de massa	64
3. RESULTADOS.....	65
3.1 Análise do proteoma diferencial de raízes de soja em cultivares contrastantes ao déficit hídrico	65
3.1.1 Principais proteínas diferencialmente expressas na condição irrigada nos genótipos contrastantes	65

3.1.2 Proteínas diferencialmente expressas na presença de déficit moderado nos genótipos contrastantes.....	72
3.1.3 Proteínas diferencialmente expressas sob déficit severo nos genótipos contrastantes	77
3.2 Proteoma diferencial de proteínas responsivas ao déficit hídrico no cultivar tolerante (Embrapa 48).....	83
3.3 Alterações no padrão de fosforilação pela detecção com ProQ-Diamond em genótipos contrastantes de soja submetidos ao déficit hídrico	88
3.3.1 Fosfoproteoma de raiz de soja nos genótipos contrastantes na condição irrigada .	90
3.3.2 Fosfoproteoma em raízes de soja nos genótipos contrastantes sob déficit moderado	91
3.3.3 Fosfoproteoma de raiz de soja nos genótipos contrastantes sob déficit severo.....	93
3.3.4. Fosforilações induzidas no cultivar tolerante Embrapa 48.	94
4. DISCUSSÃO	96
4.1 Proteoma diferencial das raízes entre os cultivares tolerante (Embrapa48) e sensível a seca (BR16).....	96
4.1.1 Proteoma diferencial das raízes na ausência de estresse hídrico	96
4.1.2 Proteínas responsivas aos déficits hídricos, moderado e severo, no cultivar tolerante.	99
4.1.3 Proteínas diferencialmente expressas entre os cultivares sob estresse moderado e associadas a tolerância a seca	101
4.1.4 Proteínas diferencialmente expressas entre os cultivares sob estresse severo e associadas a tolerância à seca	102
4.1.5. Fosforilações induzidas por estresse hídrico no cultivar tolerante	103
4.1.6. Fosforilações induzidas entre os cultivares sob estresse moderado e severo em raízes de soja	105
5. CONCLUSÕES.....	107
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
7. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	120

RESUMO

MESQUITA, Rosilene Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2013.
Determinantes fisiológicos e moleculares da resposta diferencial à seca em soja.
Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Coorientador: Humberto Josué de Oliveira Ramos.

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar fisiologicamente e identificar proteínas diferencialmente expressas e fosforiladas em raízes de genótipos de soja contrastantes para tolerância à seca, sendo um tolerante (Embrapa 48) e um sensível (BR 16), de forma a melhor entender os mecanismos de resposta e identificar proteínas candidatas no desenvolvimento de estratégias para aumento da tolerância à seca. As plantas foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle) e sob déficit hídrico imposto pela suspensão da irrigação até que as plantas atingissem os potenciais hídricos na antemanhã (Ψ_{am}) de -1,0 MPa (moderado) e -1,5 MPa (severo). As análises fisiológicas mostraram que esses cultivares exibem mecanismos diferenciais em resposta ao déficit hídrico. O cultivar Embrapa 48 retardou a desidratação em dois dias, mantendo A , ETR e Φ_{PSII} maior mesmo sob déficit. Este resultado não foi relacionado a alterações na g_s ou na composição isotópica do ^{13}C , sugerindo a importância na condutividade hidráulica nesta tolerância, e a uma maior indução do crescimento radicular sob deficiência hídrica. Além disso, em folhas, apresentou menor dano oxidativo e a análise de perfil metabólico evidenciou um maior ajuste osmótico pelo acúmulo de açúcares e aminoácidos. Nas raízes, apresentou maior acúmulo de ácidos orgânicos, intermediários da glicólise e Ciclo de Krebs, além de aminoácidos. O cultivar tolerante também apresentou maiores níveis foliares e radiculares de ABA. Houve uma manutenção do crescimento radicular no tolerante e redução do crescimento relativo da parte aérea. A enxertia recíproca confirmou a importância da condutividade hidráulica no mecanismo de tolerância do genótipo tolerante, indicando o sistema radicular como um dos principais fatores que contribuem para a maior tolerância nesse cultivar. As proteínas diferencialmente expressas e fosfoproteínas foram analisadas através de 2D-SDS PAGE e detectadas com CCB (proteínas diferenciais) e Pro-Q DPS (proteínas fosforiladas) associadas a identificação por MS. A análise diferencial das proteínas de raízes revelou mecanismos de tolerância ao déficit hídrico relacionado aos mecanismos de respiração, metabolismo antioxidativo, metabolismo secundário e metabolismo de aminoácidos, entrando em conformidade com as diferenças encontradas no perfil metabólico. O fosfoproteoma apresentou uma correlação com o proteoma diferencial na ausência e na presença de déficit severo com muitas proteínas comuns às duas

abordagens. A respiração foi o grupo cuja fosforilação foi fortemente afetada em resposta à seca, sendo representada por 12 proteínas. Adicionalmente, várias enzimas da respiração, síntese de aminoácidos e mecanismo antioxidativo, tiveram aumento em sua fosforilação sem apresentar alterações em sua abundância, providenciando mais evidências para a resposta diferencial da respiração na tolerância à seca em soja. A análise conjunta somente no genótipo tolerante permitiu observar que o aumento da fosforilação de uma proteína pode ser transiente com o estresse. Os resultados também sugerem um papel adicional do ABA na resposta ao estresse hídrico, induzindo cascatas cinases e aumentando a respiração para permitir a menor redução crescimento radicular em resposta à seca, o que poderia explicar o maior volume radicular observado no cultivar tolerante sob seca. A fosforilação participa nas características do proteoma com maiores níveis na abundância e na fosforilação em muitas proteínas no tolerante. Estes resultados reforçam a visão de que a tolerância à seca é uma herança quantitativa, onde vários mecanismos estão envolvidos.

ABSTRACT

MESQUITA, Rosilene Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2013. **Physiological and molecular determinants of differential response to drought in soybean.** Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-adviser: Humberto Josué de Oliveira Ramos.

The goal of this work was the physiological comparison and identification of proteins differentially expressed and phosphorylated in roots of soybean plants with contrasting tolerance to drought (Embrapa 48, tolerant, BR 16, sensitive) with the ultimate aim of improving our understanding of the mechanisms involved in water deficit responses and identifying candidate proteins for stress tolerance engineering. Plants were evaluated under irrigated conditions (control) and under water deficit imposed by the suspension of irrigation until plants reached pre-dawn water potentials (Ψ_{am}) of -1.0 MPa (moderate) or -1.5 MPa (severe). Physiological analyses indicate that the two cultivars exhibit different responses to water deficit. The Embrapa 48 cultivar showed a two days delay in dehydration, maintaining greater values of A , ETR and $\Phi PSII$ even under water deficit. This result was not related to alterations in g_s or in ^{13}C isotope composition, suggesting that hydraulic conductivity and induction of root growth might be important factors for this tolerance. In addition, leaves of Embrapa 48 exhibited less oxidative damage and an adjustment in metabolite profile with a higher accumulation of sugars and amino acids. Metabolite profiling of roots indicated greater accumulation of organic acids, glycolytic and Krebs cycle intermediates as well as amino acids. The tolerant cultivar also presented increased levels of ABA in both leaves and roots. Induction of root growth occurred in the tolerant cultivar with a decrease in relative growth of the aerial parts of these plants. Reciprocal grafting experiments confirmed the importance of hydraulic conductance in the tolerance mechanism of Embrapa 48, indicating the root system as one of the major factors that contributes to the greater tolerance of this cultivar. Differentially expressed proteins and phosphoproteins were analysed using 2D-SDS-PAGE, detected using CCD (differentially expressed proteins) or Pro-Q DPS (phosphorylated proteins) and identified by mass spectrometry. Differential analysis of root proteins revealed a relationship between tolerance to drought and respiration, antioxidant metabolism, secondary metabolism and amino acid metabolism, in agreement with the metabolite profiling experiments. The phosphoproteomic analysis indicated a correlation with the differential proteomic approach in the absence and presence of severe water deficit with many proteins common to the two

methods. Respiration was the group in which phosphorylation was strongly affected in response to lack of water, being represented by 12 proteins. Additionally, several enzymes of respiration, synthesis of amino acids and antioxidative mechanism, had increased in its phosphorylation without changes in their abundance, providing more evidence for differential response of respiration in drought tolerance without soybean. The combined analysis for the tolerant genotype indicated that the increase in phosphorylation of a protein can be transient with the stress. The results here suggest a new role for ABA in water deficit, inducing kinase cascades and inducing respiration in order to allow lower reductions in root system under drought. The phosphorylation participates in the characteristics of the proteome with higher levels in abundance and phosphorylation of many proteins in tolerant. Altogether, data reinforce the view that drought tolerance is a quantitative trait, where several mechanisms are involved.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja é a cultura oleaginosa líder da economia mundial. O grão processado é também a maior fonte alimentícia de óleo vegetal e proteínas, além de ser uma fonte de macronutrientes e minerais. Essa oleaginosa contém metabólitos secundários, tais como isoflavonas (Sakai & Kogiso, 2008), saponinas, fitatos, oligossacarídeos (Liener, 1994) e fitoestrógenos (Ososki & Kennelly, 2003). É vista como uma cultura atraente para a produção de biodiesel (Pimentel & Patzek, 2008). Também tem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (Burris & Roberts, 1993) e, portanto, requer a entrada mínima de fertilizantes nitrogenados.

As plantas estão ou podem estar submetidas a uma série de estresses bióticos e abióticos que afetam seu crescimento e desenvolvimento. Um terço da população mundial reside em regiões com restrição hídrica e, segundo previsões de mudanças climáticas futuras, a seca poderá se tornar mais freqüente e mais intensa (Cutforth et al., 2007).

O déficit hídrico é um dos principais fatores abióticos que afeta a produção agrícola global (Sharma & Lavanya, 2002) induzindo respostas fisiológicas e bioquímicas nas plantas incluindo fechamento estomático, redução do crescimento celular, redução da taxa fotossintética, ajustamento osmótico, redução na eficiência do uso da água, alteração da partição de assimilados e dos mecanismos de defesa contra danos oxidativos (Ludlow & Muchow, 1990; Shinozaki & Yamagusho-Shinozaki, 2007). Essas respostas correspondem a mecanismos de adaptação ou tolerância em níveis moleculares e celulares (Shinozaki & Yamagusho-Shinozaki, 2007). Algumas respostas são comuns quando o déficit hídrico é imposto rapidamente ou lentamente, porém as tendências observadas nas espécies tolerantes ao estresse hídrico por um curto tempo não são igualmente aplicáveis às espécies expostas a um estresse hídrico mais lento e prolongado, como ocorre na natureza (Waseem et al., 2011).

Paralelamente às alterações, em decorrência do estresse hídrico, que ocorrem no cloroplasto, alterações nos processos mitocondriais, como respiração, podem também acontecer devido sua interação com a via fotossintética (Raghavendra & Padmasree, 2003). A cadeia respiratória é responsável pela dissipação do excesso de poder redutor originado nos cloroplastos (Raghavendra & Padmasree, 2003) e estudos têm destacado que plantas com alguma disfunção mitocondrial possuem uma menor capacidade fotossintética (Giraud

et al., 2008; Juszczuk et al., 2007; Nunes-Nesi et al., 2007), evidenciando que a respiração é uma importante via metabólica que se relaciona com a tolerância à seca.

Outro mecanismo importante relacionado à tolerância à seca é o ajuste osmótico (AO) que consiste no aumento líquido de solutos nas células em resposta ao estresse hídrico (Morgan, 1984), permitindo a manutenção do turgor em menor potencial hídrico. Os osmoprotetores incluem aminoácidos (por exemplo, prolina e aspartato), açúcares (por exemplo, sacarose, glicose, manitol e trealose), polióis, compostos de amônio quaternário (glicina-betaina e alanina-betaina), ácidos orgânicos, entre outros (Cortina & Marcia, 2005; Rontein et al., 2002). Por exemplo, a trealose, um dissacarídeo não redutor que funciona como um soluto compatível protegendo estruturas biológicas sob estresse, tem sido usada para aumentar a tolerância à seca em arroz e tomate (Cortina & Marcia, 2005; Garg et al. 2002). Outros metabólitos já são bem documentados na participação no AO como a prolina e glicina-betaina, no entanto outros metabólitos merecem igual atenção por exercerem funções osmoprotetoras.

As plantas adaptadas à seca e, portanto, tolerantes, são frequentemente caracterizadas por um profundo e vigoroso sistema radicular (Annicchiarico, 2007), de maneira que a profundidade do sistema radicular e alterações na resistência ao fluxo de água dentro desta estrutura podem ser importantes atributos sob baixa disponibilidade hídrica (Monneveux & Belhassen, 1996). A combinação de mecanismos que restrinjam a perda de água associada a um sistema radicular profundo pode ser decisiva para a sobrevivência e/ou relativa estabilidade da produção de plantas tolerantes a seca, quando cultivadas em ambientes sujeitos a estiagens prolongadas (Padilha & Pugnaire, 2007; Songsri et al., 2008).

A sinalização envolvendo raiz-parte aérea é importante na regulação do crescimento da parte aérea e também no uso da água, permitindo a planta perceber a escassez hídrica no solo antes que as alterações no status hídrico sejam detectadas na folha (Dodd, 2005). As respostas das plantas às condições de déficit hídrico envolvem uma série de mudanças adaptativas a efeitos deletérios associados a respostas de tolerância. Sob condições de campo essas respostas podem ser antagonística ou sinergisticamente modificadas pela interação com outros estresses (Chaves et al., 2002; Schachtman & Goodger, 2008).

A tolerância à seca pode estar ligada a aumentos na eficiência na absorção de água no solo, especialmente por meio do desenvolvimento de um extenso e profundo sistema

radicular e de características da parte aérea como adequação da área foliar, rápido fechamento estomático e manutenção de uma dissipação de energia térmica foliar (Li et al., 2000). Além desses, o ácido abscísico (ABA) está intimamente relacionado com mecanismos de tolerância, pois seus níveis tendem a aumentar consideravelmente em condições de déficit hídrico (Silva, 2007; Sreenivasulu et al., 2012). A regulação dos processos fisiológicos e tolerância à seca mediadas por ABA está associada a alterações no seu conteúdo, o que é determinado pela sua taxa de biossíntese, degradação e transporte entre os diferentes órgãos e da sensibilidade da célula e/ou tecido ao ABA (Sreenivasulu et al., 2012). Silva (2007), em estudo com café, constatou que à medida que o potencial hídrico foi reduzido, o ABA foliar foi aumentado. Entretanto, não existem na literatura dados sobre o envolvimento dos processos de síntese, degradação e transporte de ABA no mecanismo de tolerância à seca em grandes culturas como a soja.

A formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) aumenta quando as plantas são submetidas a estresses abióticos, como a seca. As ERO são resultados da inibição da fotossíntese, da predominância da fotorrespiração e outros mecanismos que causam estresse oxidativos nas células (Noctor et al., 2002). O estresse hídrico, geralmente, aumenta a formação de ERO, as quais, em baixos níveis, desempenham um importante papel na sinalização intra e intercelular, mas quando presente em níveis elevados podem causar danos a componentes celulares (por exemplo, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos) (Smirnoff, 1993; Doke 1997; Dat et al. 2000; Overmyer et al. 2003).

As plantas, especialmente aquelas que vivem em ambientes estressantes, evoluíram complexos sistemas antioxidantes de defesa, enzimáticos e não enzimáticos, para regular as concentrações endógenas de ERO durante todo o seu desenvolvimento. No entanto, o dano oxidativo pode ocorrer quando a formação de ERO e as defesas antioxidantes tornam-se desequilibradas (Dat et al., 2000; Doke, 1997; Mahalingam & Fedoroff 2003). Os metabólitos secundários também desempenham um importante papel no metabolismo antioxidativo em plantas estressadas. Esses metabólitos secundários são sintetizados a partir de metabólitos primários (por exemplo, carboidratos, lipídios e aminoácidos) e muitas vezes podem conferir proteção contra estresses ambientais (flavonoides e fenilpropanoides) (Winkel-Shirley, 2001).

Em nível molecular, em plantas sob o estresse hídrico ocorre uma série de respostas desde a percepção e a ativação de rotas de sinalização até alterações na expressão gênica.

Essas respostas são necessárias para induzir alterações fisiológicas no crescimento e desenvolvimento das plantas contribuindo assim, para a redução dos danos associados a este estresse. Uma das respostas é alteração na expressão gênica, como evidenciado pela síntese de novas proteínas e de RNA mensageiro. Essas mudanças são dependentes da espécie vegetal e do estágio de desenvolvimento, assim como da severidade do estresse (Manavalan et al., 2009).

Muitas são as rotas que apresentam alterações decorrentes do estresse, entre as quais destacam-se as alterações na tradução de proteínas envolvidas nas cascatas de sinalização, controle transcricional, proteção a componentes celulares como membranas e proteínas, ajustamento osmótico, movimento de água e íons, e de detoxificação (Bray, 1993; Manavalan et al., 2009; Wang et al., 2003). A análise proteômica tem sido utilizada para a identificação de proteínas diferencialmente expressas permitindo a identificação de genes envolvidos em processos biológicos importantes em diferentes rotas metabólicas relacionadas à tolerância à seca.

Por meio de estudos de mapas de proteínas diferencialmente expressas em raízes de *Coffea canephora* em géis bidimensionais, sob condições de déficit hídrico, verificou-se aumento na expressão de enzimas glicolíticas e do Ciclo de Krebs (Soares, 2008). Estes resultados indicam um papel da respiração como mecanismo de drenagem de excesso de poder redutor associado com a redução da fotossíntese líquida sob condições de estresse e mecanismos de aclimação relacionados ao aumento do *pool* de hexoses na raiz, deslocamento de intermediários destas vias para outras rotas biossintéticas como biossíntese de lipídeos e via das pentoses fosfatadas.

Outro campo promissor para melhor compreensão dos mecanismos de tolerância à seca é a fosfoproteômica, sendo um campo ainda recente em estudos com plantas de importância econômica (Jensen, 2007; Mann & Jensen, 2003). O principal objetivo dessa abordagem é mapear as redes de fosforilação e compreender como a fosforilação de proteínas alvo pode regular e controlar processos celulares envolvidos nos mecanismos de tolerância (Rampitsch & Bykova, 2012).

Já a abordagem metabolômica fornece uma visão menos tendenciosa dos fenótipos, permitindo a análise global dos metabólitos, uma vez que as repercussões de uma única alteração genética pode não estar limitada a uma rota bioquímica (Fiehn, 2002). A soja tem sido objeto de poucos estudos que examinam respostas de metabólitos à seca, e esses

poucos registros usaram como alvo de análises apenas poucas classes de compostos.

Nesse sentido, neste trabalho procurou-se caracterizar fisiologicamente e identificar proteínas diferencialmente expressas e fosforiladas em raízes de genótipos de soja contrastantes para tolerância à seca. Objetivou-se assim melhor entender os mecanismos de resposta à seca em soja e identificar proteínas candidatas no desenvolvimento de estratégias para aumento da tolerância à seca.

Cumprir registrar que a associação entre as análises do proteoma, fosfoproteoma e do perfil metabólico em genótipos contrastantes à seca fornecerá uma visão mais integrada da biologia de sistemas do ponto de vista mais real (mais próximo ao fenótipo), permitindo a compreensão e exploração de recursos para programas de melhoramento da soja. Igualmente, a descoberta dos genes candidatos que codificam proteínas de interesse responsáveis pela regulação e produção dos compostos de interesse fornecerão ferramentas importantes para programas de melhoramento genético tradicional através de marcadores funcionais e para engenharia genética.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Annicchiarico, P. Lucerne shoot and root traits associated with adaptation to favorable or drought-stress environments and to contrasting soil types. *Field Crops Research* 102: 51 - 59, 2007.
- Bray, EA. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* 103: 1035 - 1040, 1993.
- Burris RH, Roberts GP. Biological nitrogen fixation. *Annual Review of Nutrition* 13: 317–335, 1993.
- Chaves, MM, Pereira, JS, Maroco, J, Rodrigues, ML, Ricardo, CP, Osorio ML, Carvalho I, Faria TC. Pinheiro C. How plants cope with water stress in the field. *Annals Botany* 89: 907 – 916, 2002.
- Cortina C, Culiáñez-Macià F. Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science* 169: 75 – 82, 2005.
- Cutforth HW, McGinn SM, McPhee KE, Miller PR. Adaptation of pulse crops to the changing climate of the Northern Great Plains. *Agronomy Journal* 99: 1684 – 1699, 2007.
- Dat J, Vandenbeeke S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegm F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Molecular Life Science* 57: 779 – 795, 2000.
- Dodd IC. Root-to-shoot signalling: assessing the roles of ‘up’ in the up and down world of long-distance signalling in plant. *Plant and Soil* 274: 251 – 270, 2005.
- Doke N. The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress. In: Scandalios JG, ed. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 785–813, 1997.
- Fiehn O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48: 155–171, 2002.
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV, Wu RJ. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 15898 – 15903, 2002.
- Giraud E, Ho LHM, Clifton R. The absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiology* 147: 595 – 610, 2008.
- Jensen SS, Larsen MR. Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21: 3635–3645, 2007.
- Juszczuk IM, Flexas J, Szal B, Dabrowska Z, Ribas-Carbo M, Rychter AM. Effect of mitochondrial genome rearrangement on respiratory activity, photosynthesis,

- photorespiration and energy status of MSC16 cucumber (*Cucumis sativus*) mutant. *Physiologia Plantarum* 131: 527 – 541, 2007.
- Li C, Berninger F, Kostela J, Sonninen E. Drought responses of *Eucalyptus microtheca* provenances depend on seasonality of rainfall in their place of origin. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 231 - 238, 2000.
- Liener IE. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34 : 31 – 67, 1994.
- Ludlow MM, Muchow RCA. Critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. *Advanced Agronomy* 43: 107 – 153, 1990.
- Mahalingam R, Fedoroff N. Stress response, cell death and signalling: The many faces of reactive oxygen species. *Physiology Plantarum* 119: 56 – 68, 2003.
- Manavalan LP, Guttikonda SK, Tran, L-SP. Nguyen, H.T. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant Cell Physiology* 50: 1260–1276, 2009.
- Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology* 21: 255–261, 2003.
- Monneyeux P, Belhassen E. The diversity of drought adaptation in the wide. *Plant Growth Regulation* 20: 85-92, 1996.
- Morgan JM. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 35: 299 - 319, 1984.
- Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Driscoll S, Novitskaya, L, Foyer, CH. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? *Annual Botany* 89: 841 – 850, 2002.
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR. Deficiency of mitochondrial fumarate hydratase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *The Plant Journal* 50: 1093 – 1106, 2007.
- Ososki AL, Kennelly EJ. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytotherapy Research* 17 : 84 – 869, 2003.
- Overmyer K, Brosche M, Kangasjärvi J. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in Plant Science* 8: 335 - 342, 2003.
- Padilha FM, Pugnaire FI. Rooting depth and soil moisture control Mediterranean woody seedling survival during drought. *Functional Ecology* 21: 489 - 495, 2007.
- Pimentel D, Patzek T. Ethanol production using corn, switchgrass and wood; biodiesel production using soybean . In *Biofuels, Solar and Wind as Renewable Energy Systems* . Edited by Pimentel , D. pp. 373 – 394. Springer, New York, 2008.

- Raghavendra AS, Padmasree K. Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends in Plant Science* 8: 546 – 553, 2003.
- Rampitsch C, Bykova NV. The beginnings of crop phosphoproteomics: exploring early warning systems of stress. *Frontiers in Plant Science* 3: 1-5 article 144, 2012.
- Rontein D, Basset G, Hanson AD. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metabolic Engineer* 4: 49 - 56, 2002.
- Sakai T, Kogiso M. Soyisoflavones and immunity. *Journal Medical Investment* 55: 167 – 173, 2008.
- Schachtman DP, Goodger JQD. Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science* 13: 281 - 287, 2008.
- Sharma KK, Lavanya M. Recent developments in transgenic for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics. In *JIRCAS Working Report* pp. 61 – 73, 2002.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 221 - 227, 2007.
- Silva VP. Caracterização fisiológica da tolerância a seca em *Coffea canefora*: contribuição relativa do sistema radicular e parte aérea. Viçosa, UFV, 2007, 57pp (Tese de doutorado).
- Smirnoff N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessication. *New Phytologist* 125: 27 - 28, 1993.
- Soares CQG. Proteômica diferencial e caracterização fisiológica de dois clones de *Coffea canefora* sob déficit hídrico. Viçosa, UFV, 2008, 98pp (Dissertação de mestrado).
- Songsri P, Jogloy S, Vorasoot N, Akkasaeng C, Patanothai A, Holbrook CC. Root distribution of drought-resistant peanut genotypes in response to drought. *Journal Agronomy & Crop Science* 194: 92 - 103, 2008.
- Sreenivasulu N, Harshavardhan VT, Govind G, Seiler C, Kohli, A. Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? *Gene* 506: 265 – 273, 2012.
- Wang W, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1 - 14, 2003.
- Waseem M, Ali A, Tahir M, Nadeem MA, Ayub M, Tanveer A, Ahmad R, Hussain M. Mechanism of drought tolerance in plant and its management through different methods. *Continental Journal Agricultural Science* 5: 10 - 25, 2011.
- Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126:485-493, 2001.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E METABÓLICA DE GENÓTIPOS DE SOJA CONTRASTANTES PARA TOLERÂNCIA À SECA

1. INTRODUÇÃO

O estresse hídrico pode potencializar a partição de biomassa para as raízes, aumentando a razão raiz/parte-aérea (Huck et al., 1983), aumentando o campo de absorção de água e nutrientes, e em soja já foram encontradas correlações significativas entre tolerância à seca e características do sistema radicular, tais como peso seco, comprimento total, volume e número de raízes laterais (Liu et al., 2005; Manavalan et al., 2009; Read & Bartlett, 1972).

Nesse contexto o sistema radicular apresenta sua importância em servir como fonte essencial de água e nutrientes para a parte aérea das plantas e, assim, em muitas circunstâncias, reduções do crescimento da parte aérea podem ser explicadas pela inabilidade do sistema radicular em suprir essas necessidades (Dood, 2005). Pesquisas para entendimento da relação existente entre a raiz e a parte aérea, na sinalização e na resposta a estresses, têm aumentado nas últimas décadas (Christman et al., 2007; Goodger et al., 2005; Neumann et al., 2007; Thompson et al., 2007). Adicionalmente, as plantas são capazes de detectar a deficiência de água no solo independente de alterações no status hídrico da parte aérea mediante transferência de sinais químicos da raiz para parte aérea (Liu et al., 2003). Tais resultados evidenciam a existência de uma estreita comunicação entre ambos os órgãos, e desta forma, facilitando a percepção de sinais a longas distâncias.

A manipulação das interações entre raiz e parte aérea através do uso de técnicas de enxertia pode aperfeiçoar uma série de mecanismos envolvidos no desenvolvimento vegetativo e melhorar o rendimento e qualidade de cultivares (Castle, 2005; Lockard & Schneider, 1981; Silva, 2007). Dentre esses mecanismos, alterações nos fatores endógenos de crescimento envolvendo hormônios, proteínas, vitaminas (Atkinson et al., 2003), e ainda o aumento na tolerância a estresses abióticos (Cuartero et al., 2006), parecem ser importantes.

O ABA é um fitohormônio que exerce função essencial nas respostas adaptativas a estresses por seca em plantas. Seu acúmulo promove um maior controle estomático e regula a expressão de muitos genes, cujos produtos podem proteger tecidos da desidratação

(Hirayama & Shinozaki, 2007). Em adição, o ABA desempenha um papel central em muitas fases do desenvolvimento vegetal, tais como a maturação da semente e dormência. Assim, o ABA pode ser considerado como um fitohormônio relacionado com o estresse hídrico, que contribui para a tolerância a desidratação (Hirayama & Shinozaki 2010).

Os mecanismos envolvidos na tolerância à seca englobam inúmeros processos como sinalização e percepção do estresse, ativação de genes, trocas gasosas, defesa antioxidativa, síntese de osmoprotetores, aumento de aminoácidos e ácidos orgânicos relacionados à tolerância à seca e à compreensão, embora parcial, dessa cascata de eventos é de fundamental importância para o entendimento dos mecanismos de tolerância à seca apresentados pelos cultivares tolerantes (Chinnusamy et al., 2005; Manavalan et al., 2009; Flexas et al., 2004).

Considerando a grande importância econômica da soja e as perdas causadas pela seca, associados à necessidade do entendimento do mecanismo de tolerância, objetivou-se com o presente trabalho compreender os mecanismos de tolerância por meio da caracterização fisiológica, metabólica e também o papel do ABA e influência do sistema radicular para tolerância à seca em genótipos de soja contrastantes à tolerância a seca.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no período de abril a junho de 2011, e repetido na mesma época no ano de 2012, com temperatura ambiente de $30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 20\%$.

As sementes de soja dos cultivares Embrapa 48 (genótipo tolerante ao déficit hídrico) e BR 16 (genótipo sensível ao déficit hídrico), cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA SOJA, Londrina, Paraná), foram germinadas em substrato comercial Plantmax®, onde permaneceram por 10 dias. Em seguida, as plântulas de cada genótipo foram transplantadas, três a três, para vasos de 10 litros contendo solo com adubação natural com esterco bovino curtido (30% areia, 40% solo vermelho amarelo, 30% esterco bovino). Quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento V4 (Fehr & Caviness, 1977) ou período de pré-floração (43 dias após a semeadura - DAS), foram iniciados os tratamentos.

As plantas, ao atingirem o estágio de desenvolvimento V4, foram avaliadas em condições de plena irrigação (controle) ou submetidas a déficit hídrico, imposto pela suspensão da irrigação, até propiciar um potencial hídrico na antemanhã (Ψ_{am}) de $-1,0 \pm 0,1$ MPa e $-1,5 \pm 0,1$ MPa, valores que caracterizam uma condição de estresse moderado e severo para plantas de soja, respectivamente, definidos em estudos preliminares com os mesmos genótipos. Além desses tratamentos, foi mantido um quarto grupo, no qual as plantas ao atingirem o déficit severo foram reidratadas pela retomada da irrigação e avaliadas após quatro dias da reidratação, a fim de avaliar as respostas de recuperação à seca.

Por ocasião da coleta, as folhas de soja foram acondicionadas em envelopes de papel aluminizado, congeladas com nitrogênio líquido, e armazenadas a -80°C , até posterior uso.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), num arranjo fatorial 4×2 , com o primeiro fator correspondendo aos tratamentos e o segundo aos genótipos contrastantes, com 5 repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), sendo posteriormente aplicado um teste de médias, Tukey a 5% de probabilidade utilizando o software Assistat®.

2.2 Caracterização das respostas fisiológicas

2.2.1 Potencial hídrico foliar;

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

2.2.2 Trocas gasosas;

A taxa de assimilação líquida do CO₂ (*A*), a condutância estomática ao vapor d'água (*g_s*), a taxa transpiratória (*E*) e razão interna e externa de carbono (razão *C_i/C_a*) foram realizadas em folhas completamente expandidas do quarto trifólio a partir do ápice, por intermédio de um analisador de gases a infravermelho (IRGA; modelo portátil LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincon, Nebraska, USA). As medições foram realizadas entre 08:00 e 11:00 a.m., em casa de vegetação, utilizando radiação fotossinteticamente ativa (*PAR*) constante (1000 μmol fótons m⁻²s⁻¹), concentração atmosférica de CO₂, temperatura e umidade ambiente. A eficiência instantânea do uso da água foi calculada pela razão *A/E* e a eficiência de carboxilação pela razão *A/C_i*.

2.2.3 Parâmetros de fluorescência

As variáveis de fluorescência da clorofila *a* foram obtidas na mesma área da folha em que foram realizadas as medidas das trocas gasosas, com auxílio de um fluorômetro acoplado ao IRGA. As folhas foram adaptadas ao escuro para que os centros de reação estivessem completamente abertos (todos os aceptores primários oxidados) com perda de calor mínima. As variáveis de indução da fluorescência obtidas foram: fluorescência inicial (*F₀*); fluorescência máxima (*F_m*); fluorescência variável (*F_v*), determinada pela diferença entre *F₀* e *F_m*. Com os valores de *F_v* e *F_m* foi obtido o rendimento quântico potencial do PSII (*F_v/F_m*) (Genty et al., 1989). As variáveis da fase lenta de indução da fluorescência foram obtidas sequencialmente com a aplicação de uma iluminação actínica e um pulso de luz actínica saturante para a determinação das variáveis: fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (*F*) e fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (*F_m'*). A partir desses parâmetros foi possível calcular: a fluorescência mínima do tecido vegetal iluminado (*F₀'*) (Oxborough & Baker, 1997) e a estimativa de centros de reações abertos do FSII (*qL*) (Kramer et al., 2004). Os rendimentos quânticos: efetivo do fluxo

linear de elétrons pelo PSII ((Y(II))), da dissipação de energia regulada (Y(NPQ)) e da dissipação de energia não regulada ((Y(NO))) foram calculados de acordo com Genty et al. (1989) e Hendrickson et al. (2004). O Y(II) foi utilizado ainda para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) (Bilger et al., 1995). O coeficiente de extinção fotoquímico foi calculado como $qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$, e o de extinção não-fotoquímico por NPQ = $(F_m/F_m') - 1$. A fração da energia absorvida pelo complexo-antena associado ao FSII não utilizada na fotoquímica, nem dissipada termicamente, foi estimada como $P_E = (F_v'/F_m') \times (1 - q_p)$.

2.2.4. Composição isotópica de ^{13}C

As folhas coletadas foram secas em estufa de ventilação forçada à 70 °C por 72 h e posteriormente trituradas e encaminhadas ao Laboratório de Isótopos Estáveis (LIE) do Departamento de Solos (DPS) da Universidade Federal de Viçosa, onde a abundância natural do isótopo ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) foi determinada por combustão do material orgânico em analisador elementar conectado a um espectrômetro de massa de razão isotópica (ANCA GSL 20-20, Sercon, Crewe, UK). A razão isotópica foi expressa em partes por 1000 (‰) em relação ao padrão Pee Dee Belemnita (PDB), conforme a equação (Bernoux et al., 1998):

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \text{ amostra} - \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \text{ padrão}}{\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \text{ padrão}} \right) \times 1000$$

2.2.5 Determinação da peroxidação de lipídeos

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

absorbância a 440, 532 e 600 nm, segundo Hodges et al (1999). A concentração de MDA foi expressa em nmol g^{-1} MF.

2.2.6 Perfil metabólico

Os níveis relativos de metabólitos foram determinados a partir de amostras de folhas e raízes liofilizadas. Para extração, o material vegetal foi pulverizado em nitrogênio líquido e liofilizado em tubos criogênicos. Após a liofilização o material foi pesado, cerca de 10 mg, e acondicionado em microtubo (2,0 mL), adicionado 1,5 mL de solução extratora gelada ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) contendo água:metanol:clorofórmio (1:2,5:1), adicionando-se a cada amostra 60 μL de ribitol como padrão interno ($0,2\text{ mg.mL}^{-1}$ em água ultra pura), seguido por vortex e agitação por 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após, procedeu-se uma centrifugação por 5 min a $14000 \times g$ e o sobrenadante foi coletado para um novo microtubo. Com o sobrenadante foi realizado uma partição com 750 μL de água ultra pura, seguido de vortex e centrifugação por 15 min a $14000 \times g$, sendo coletada toda a parte superior (polar). Cerca de 500 μL da fase superior da centrifugação, correspondente à fase polar da amostra, foi fracionada e transferida para tubos de reação de 1,5 mL em volumes menores, secando a amostra sob vácuo (*speed vac*). Após, as amostras foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou derivatizadas seguindo o protocolo específico. A derivatização das amostras foi realizada pela adição de 40 μL de piridina (Merck) contendo metoxiamina hidrocloreto (Sigma) a 20 mg.mL^{-1} , ao recipiente contendo as amostras completamente secas, submetendo-as a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas com agitação. Logo após, foram adicionados 70 μL da solução de MSTFA (20 $\mu\text{L mL}^{-1}$ da mistura padrão do tempo de retenção), previamente preparada segundo Lisec et al. (2006), submetendo as amostras a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min. Por fim, 100 μL desta alíquota foram transferidos para frascos de vidro de amostrador automático para subsequente análise. As amostras foram analisadas utilizando um sistema GC-MS TruTOF GC-TOFM: GC Cromatógrafo Agilent, 7890A e Espectrômetro TruTOF® HT TOFMS, Leco, equipado com uma coluna capilar com 30 m (MDN-35) de acordo com Lisec et al. (2006). 1 μL da amostra foi injetada no modo *splitless* a $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ carregado pelo gás hélio (fluxo contínuo) de 2 mL min^{-1} . A temperatura do forno foi inicialmente mantida constante a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, em seguida, aumentou-se $15\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até alcançar $330\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo essa temperatura mantida durante 5 min.

Cromatogramas tiveram a linha de base corrigida e alinhada com o software MetAlign (Lommen, 2009 (analytical chemistry). Os picos foram atribuídos usando os

espectros deconvoluídos obtidos utilizando o software ChromaTOF (LECO) e bibliotecas de massa espectrais de compostos derivados de trimetilsilício (TMS) obtido do Instituto Max Planck de Fisiologia Molecular Vegetal (<http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/> / csbdb). Atribuição do pico foi verificada com o software TagFinder (Luedemann, 2008 (bioinformatics)). Áreas de picos cromatográficos para íons fragmentados anteriormente foram verificados e normalizados pela área do pico correspondente ao ribitol e corrigidas pela massa seca de amostra extraída. As áreas dos picos são expressas em relação à amostra do controle do genótipo tolerante (Embrapa 48).

2.2.7 Teores de amido e açúcares

A partir do extrato de perfil metabólico descrito no item anterior, 200 µL da fração solúvel foi seca em *speedvac* e eluídas em água ultra pura. A partir deste extrato foram determinados enzimaticamente os teores de sacarose, glicose e frutose em leitor de placa de Elisa. Já na fração insolúvel, oriundo do material precipitado na extração de perfil metabólico, foi analisado os teores de amido (Praxedes et al., 2006).

2.2.8 Quantificação do ácido abscísico (ABA)

A extração e purificação de ABA foram realizadas conforme o protocolo descrito por Durgbanshi et al. (2005), com algumas modificações. Cerca de 10 mg de material vegetal de folha e raiz pulverizado e liofilizado, foram extraídos em microtubo (1,5 mL) com metanol 80 % (v/v), adicionando-se 5 pmols de ABA deuterado (-5,8',8',8'-d4-ABA) por amostra, para determinação das perdas durante a extração, e confirmação do pico massa-carga específico no espectrômetro de massa. O tubo com o material pulverizado e liofilizado foi acondicionado em gelo e adicionado 1,0 mL de metanol 80 %, e agitado em termomix por 10 minutos a 1200 rpm. Posteriormente foi centrifugado por 5000 x g, por 10 min, a 4 °C, e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo (2 mL) previamente resfriado em gelo. O sobrenadante foi concentrado em *speedvac* para remoção do metanol por aproximadamente 1 h e 30 min, ficando um volume de extrato entre 100 e 200 µL. Após, esse volume foi completado para 500 µL com água ultra pura e feito a correção do pH para 3 por meio da adição de ácido acético a 10 %. Após a correção do pH, foi realizado uma dupla partição pela adição 500 µL de dietil-eter, seguido pela agitação por 10 min a 1200 rpm. Após a partição, as fases orgânicas foram coletadas e transferidas para um novo tubo previamente lavado com dietil-eter. O extrato obtido foi secado completamente e

ressuspendido em tampão específico para análise por sistema LC-MS (15:85:0,1 acetonitrila:água:ácido fórmico), seguido por centrifugação por 30 min a 14000 x *g*, para remoção de partículas remanescentes. Foram pipetados 200 µL do extrato de ABA em placas de 96 poços e vedadas com tampa siliconizada. As separações cromatográficas das amostras foram feitas em um cromatógrafo líquido de alto desempenho, UPLC Infinity 1200 (Agilent), pertencente ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da Universidade Federal de Viçosa, utilizando-se de coluna cromatográfica (Agilent Eclipse Plus, RRHD, 1.8 µm, 2.1x50 mm with guard column), com fluxo de 0,3 mL min⁻¹. Os tampões de eluição usados foram ácido fórmico 0,1 % em acetonitrila (A) e ácido fórmico 0,1 % em água (B) num gradiente de tempo / % B de: 0/81; 3/50; 4/10; 4,25/10; 4,5/81. A detecção foi feita utilizando um espectrômetro de massa, tipo triplo quadrupolo (Agilent 6430) com ionização *electrospray* no modo negativo. A detecção de ABA nas amostras foi feita mediante o monitoramento de reações múltiplas (MRM) via seleção da transição de massa específica da molécula de interesse (para o ABA, 263 → 153 (Dwell 200, Fragmentor 75, CE 11, Accelerator voltage 7, Negative) e, para o ABAd₄, 267 → 156 (Dwell 400, Fragmentor 75, CE 11, Accelerator voltage 7, Negative). Os dados foram processados pela plataforma MassHunter. A quantificação foi feita utilizando a razão entre as áreas dos picos do padrão interno e do ABA endógeno. Para extração do ABA na seiva xilemática, seguiu-se a mesma metodologia descrita acima, porém, foram utilizados 200 µL de seiva como ponto de partida.

2.2.9 Crescimento e pigmentos cloroplastídicos

Com a finalidade de verificar se as diferenças observadas nos estudos fisiológicos e de perfil metabólicos, tanto entre os genótipos quanto em resposta ao déficit hídrico, também era refletida no crescimento, foi conduzido outro experimento semelhante ao anterior com três regimes hídricos: ausência de déficit (controle), déficit moderado (-1,0MPa) e déficit severo (-1,5 MPa). Os parâmetros de crescimento avaliados ao final do experimento foram: volume radicular (VR), área foliar total (AF), número de folhas (NF) e crescimento relativo (Rw). Os teores de pigmentos (clorofilas a, b, totais e carotenóides) foram determinados utilizando extração com dimetilsulfóxido puro (DMSO) saturado com carbonato de cálcio (CaCO₃), conforme descrito por Wellburn (1994).

3. RESULTADOS

3.1 Potencial hídrico

Nas plantas controle de ambos os cultivares de soja (BR 16, sensível e Embrapa 48, tolerante), o potencial hídrico da antemanhã (ψ_{am}) foi sempre superior a -0,25 MPa, sendo que o cultivar tolerante apresentou potenciais mais baixos durante todo período experimental na condição irrigada (Figura 1). Após a suspensão da irrigação, a partir do segundo dia, foi observada uma redução tempo-dependente progressiva do ψ_{am} nas plantas submetidas ao déficit hídrico, sendo essa diminuição mais acelerada no sensível (BR 16) (Figura 1).

As plantas do cultivar BR 16 alcançaram o ψ_{am} em torno de -1,0 e -1,5 MPa, no sétimo e nono dia após a suspensão da irrigação, respectivamente. Por sua vez, as plantas do cultivar Embrapa 48 demandaram um maior tempo para atingir os mesmos níveis de ψ_{am} , cerca de nove e onze dias, respectivamente (Figura 1). Estes resultados são consistentes com uma melhor economia hídrica no cultivar Embrapa 48. É importante salientar que outro grupo de plantas, dos dois cultivares, ao alcançarem o potencial hídrico severo (-1,5 MPa) foram reirrigados, e quatro dias após a suspensão da irrigação recuperaram totalmente o *status* hídrico inicial, atingindo ψ_{am} de -0,16 MPa no cultivar sensível e de -0,26 MPa no cultivar tolerante.

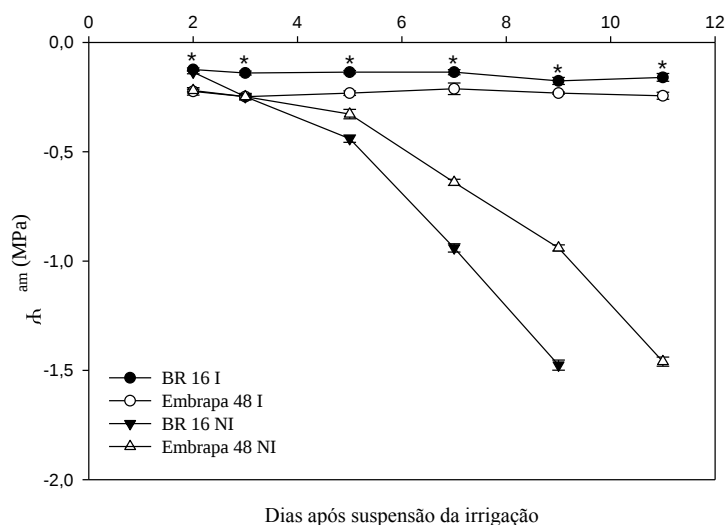


Figura 1 Perfil temporal do potencial hídrico foliar na antemanhã (Ψ_{am}) em dois cultivares de soja, um sensível (BR 16), e outro tolerante (Embrapa 48) em relação ao déficit hídrico. Cada ponto representa a média + erro padrão (n=5, onde n representa o número de plantas. I = irrigado, NI = não-irrigado (não irrigado após imposição do estresse). * indica diferença significativa entre os cultivares.

Na Figura 2, observam-se as plantas dos dois cultivares ao final do experimento. As plantas do BR 16 (Figura 2 A), apresentavam maior murcha foliar nos déficits moderado (-1,0 MPa) e severo (-1,5 MPa) em comparação com as plantas do Embrapa 48 nos mesmos níveis de déficit (Figura 2 C). Além disso, os potenciais hídricos de -1,0 MPa (déficit moderado) e -1,5 MPa (déficit severo) foram alcançados mais rapidamente pelo BR 16 (sensível). As raízes, no déficit severo, eram visivelmente mais volumosas no cultivar tolerante (Figura 2 D) em relação ao sensível (Figura 2 B).

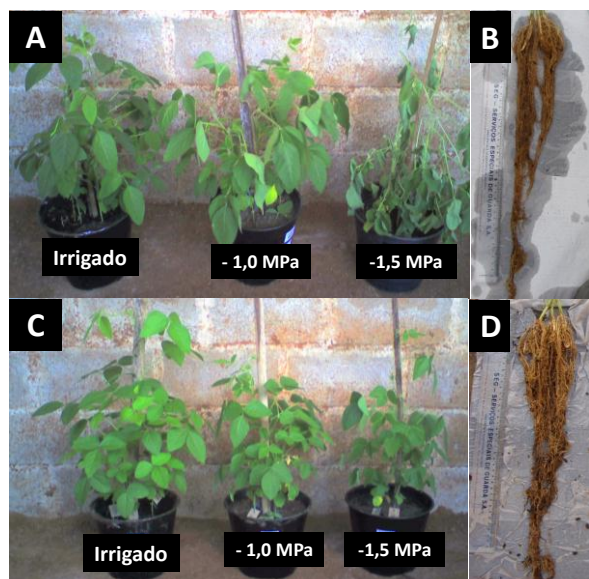


Figura 2. Visão geral das plantas no final do experimento. (A) Plantas do cultivar BR16 (sensível) nos três níveis de irrigação; (B) Sistema radicular do cultivar BR16 sob déficit severo; (C) Plantas do cultivar Embrapa 48 nos três níveis de irrigação e (D) Sistema radicular da cultivar Embrapa48 (tolerante) sob déficit severo.

3.2 Crescimento e pigmentos cloroplastídicos

Com a progressão do estresse hídrico houve uma inibição gradativa do volume radicular nos dois cultivar, tendo sempre o cultivar tolerante maior volume radicular em todos os tratamentos, com diferenças mais expressivas entre os cultivares sob déficits (Figura 3).

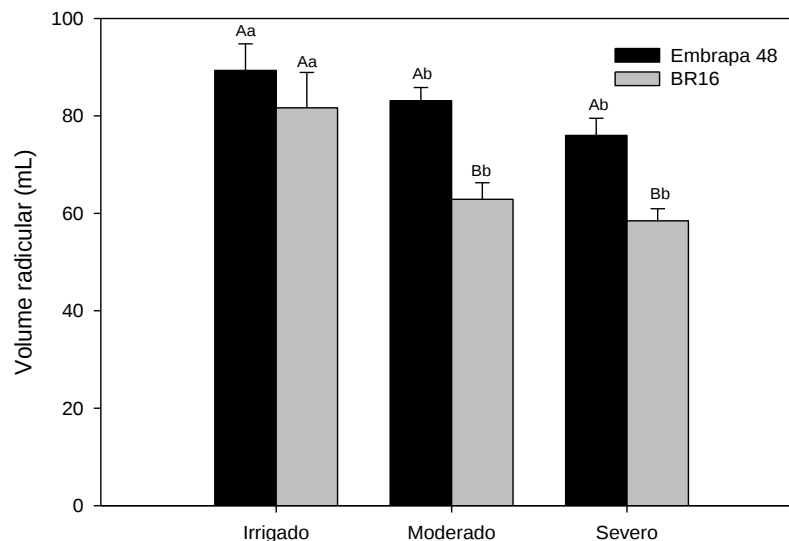


Figura 3. Volume radicular (VR) em cultivares de soja sob déficit hídrico. (■) plantas tolerantes (Embrapa 48), (■) plantas sensíveis ao déficit hídrico (BR16). Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão ($n=5$, onde n representa o número de plantas). Os diferentes grupos correspondem aos tratamentos. Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento em cultivares diferentes, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre médias dentro de um mesmo cultivar, (Tukey, $p < 0,05$). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão ($n=5$).

Em relação a área foliar total (AF), não foi observado diferença estatística entre os genótipos em todos tratamentos, ocorrendo uma redução nesse parâmetro quando imposto déficits hídricos (Figura 4).

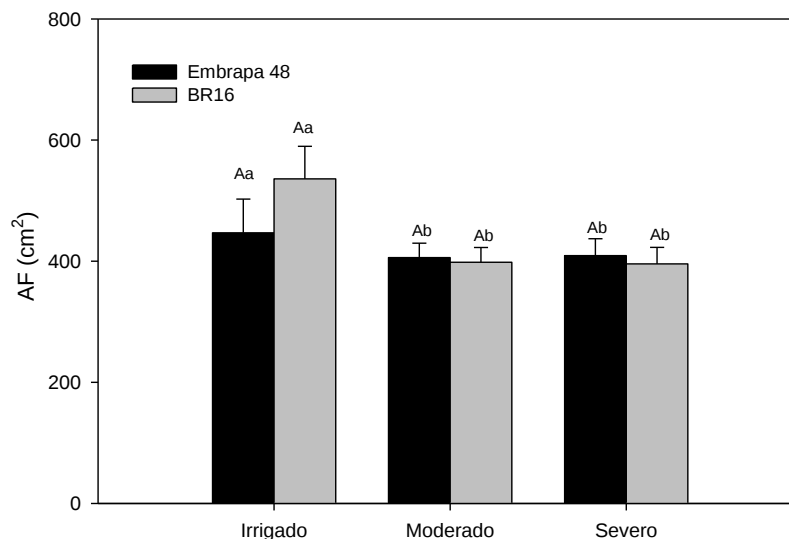


Figura 4. Área foliar total (AF) em cultivares de soja sob déficit hídrico. (■) plantas tolerantes (Embrapa 48), (■) plantas sensíveis ao déficit hídrico (BR16). Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão ($n=5$, onde n representa o número de plantas). Estatística segundo Figura 3.

O número de folhas (NF) foi sempre maior no cultivar Embrapa 48 em relação ao BR 16 em todos os tratamentos, não sendo detectadas diferenças com a imposição do déficit nesse parâmetro (Figura 5). Entretanto o tamanho das folhas do genótipo sensível são maiores, de forma que, mesmo embora tendo menor número de folhas, os dois cultivares não diferiu em nenhum tratamento quanto a área foliar total (Figura 4).

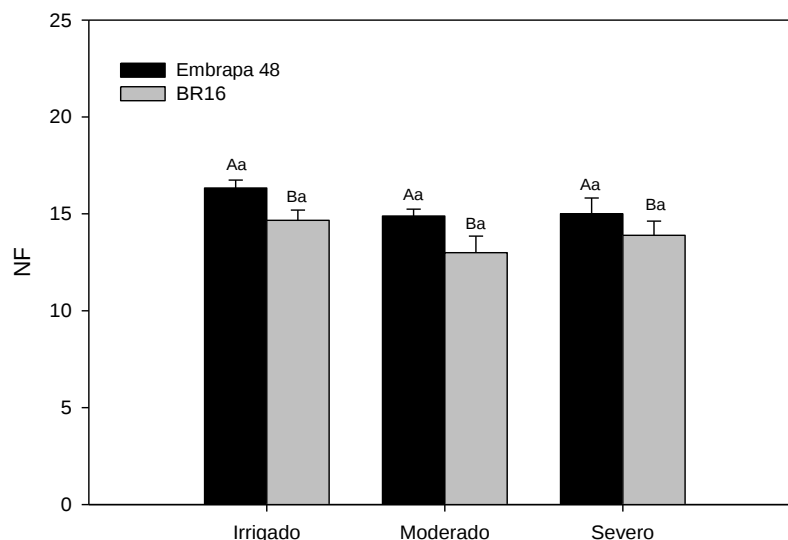


Figura 5. Número de folhas (NF) em cultivares de soja sob déficit hídrico. (■) plantas tolerantes (Embrapa 48), (■) plantas sensíveis ao déficit hídrico (BR16). Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão (n=5, onde n representa o número de plantas). Estatística segundo Figura 3.

O crescimento relativo (Rw) é calculado em função do delta da altura (altura final – altura inicial) e intervalo de tempo (dias) do período de déficit, sendo possível inferir sobre modulação do crescimento em função do déficit hídrico. O estresse hídrico produziu uma dramática inibição do crescimento (altura) das plantas em ambos cultivares (em torno de 50%), mas somente no estresse hídrico severo que observamos uma maior redução na altura para o cultivar tolerante (Figura 6). Na condição irrigada, o cultivar sensível apresenta maiores valores em relação ao tolerante (Figura 19). Esse resultado é decorrente do maior porte (altura) do cultivar sensível. Estes resultados indicam uma alocação diferencial de carbono entre os cultivares sob estresse severo, tendo o cultivar tolerante menor altura e maior volume radicular.

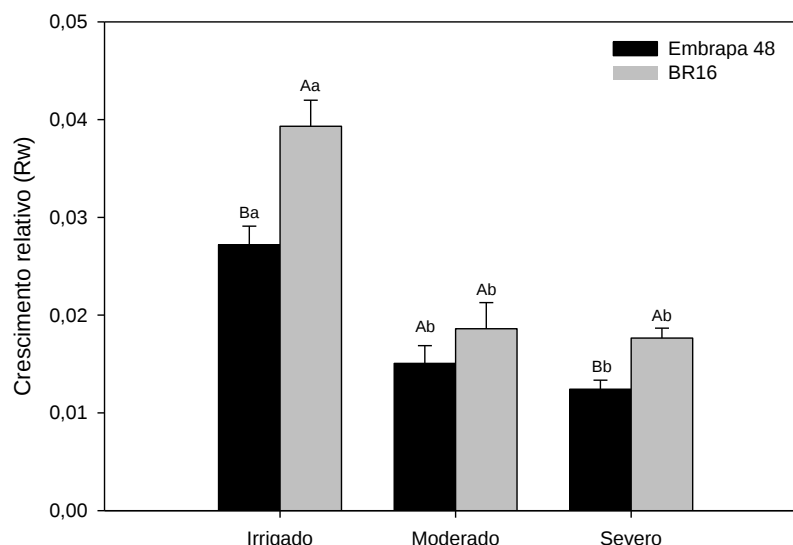


Figura 6. Crescimento relativo (Rw) em cultivares de soja sob déficit hídrico. (■) plantas tolerantes (Embrapa 48), (■) plantas sensíveis ao déficit hídrico (BR16). Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão (n=5, onde n representa o número de plantas). Estatística segundo Figura 3. O crescimento relativo foi calculada segundo a fórmula $Rw = (\ln h_1 - \ln h_0) / (t_1 - t_0)$, em que h_1 corresponde a altura final no momento da coleta e h_0 corresponde a altura inicial no momento da imposição do déficit, t_1 corresponde a idade da planta em dias até o momento da coleta e t_0 corresponde a idade em dias no momento da imposição do déficit. Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão (n=5, onde n representa o número de plantas).

Com relação aos teores de pigmentos, verificaram-se menores teores de clorofila *a* no cultivar tolerante em relação ao sensível em todos os tratamentos. Essa diferença foi mais acentuada sob déficit severo (Figura 7 A), mas o cultivar tolerante, mesmo com esta redução, possuía ainda maior ETR (Figura 9). Ao longo dos tratamentos observa-se um aumento no cultivar sensível e um aumento seguido de redução no cultivar tolerante (Figura 7 A), fato que não foi associado com maior ETR no sensível. Com relação a clorofila *b* só foi observado diferença significativa entre os cultivares no tratamento severo, com o sensível apresentando maiores teores. Ao longo dos tratamentos observa-se uma redução no cultivar tolerante com imposição do déficit moderado permanecendo constante no déficit severo e no sensível, após essa redução, houve um aumento significativo sob déficit severo (Figura 7 B). Os teores de clorofila total seguiu o mesmo padrão da clorofila *a* (Figura 7 C). Já em relação aos teores de carotenóides observam-se maiores teores no cultivar sensível com maior intensidade no déficit severo, o que foi associado ao maior NPQ e D no cultivar BR 16 (figura 11). Ao longo dos déficits houve um aumento seguido de redução nos déficits moderado e severo, respectivamente no cultivar tolerante e no sensível permaneceu constante no déficit moderado e aumentou no déficit severo (Figura 7 D).

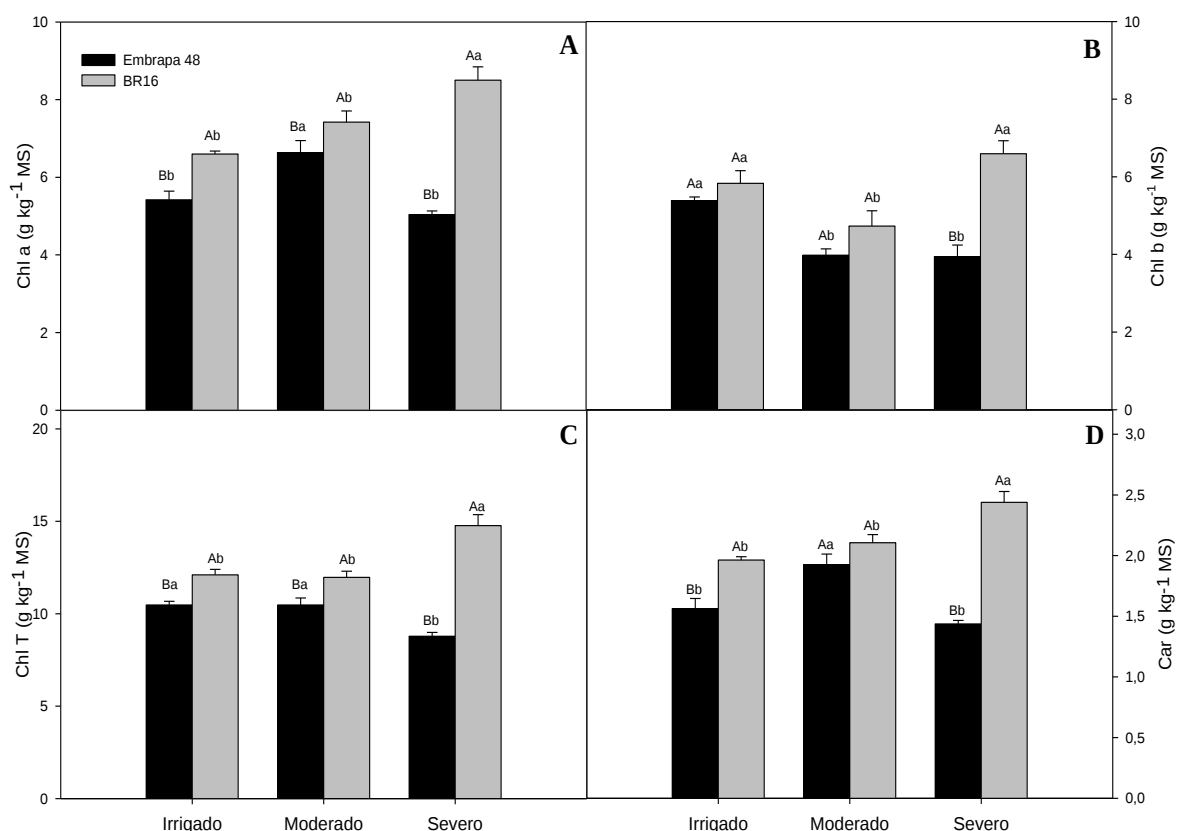


Figura 7. Teores de pigmentos em cultivares de soja. Clorofila a (A), clorofila b (B), clorofila total (C) e carotenóides (D). (■) plantas tolerantes (Embrapa 48), (■) plantas sensíveis ao déficit hídrico (BR16). Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão ($n=5$, onde n representa o número de plantas). Estatística segundo Figura 3.

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

Na ausência de estresse, a taxa fotossintética líquida (A) foi maior no cultivar Embrapa 48 em relação ao cultivar BR 16, sendo, respectivamente, 24 e $18 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e, sempre menor, em ambos na presença de estresse, não diferindo estatisticamente apenas no déficit severo (Figura 8 A). É interessante observar que a retomada da irrigação permitiu uma recuperação quase total na taxa fotossintética de ambos os cultivares, indicando que os efeitos negativos do déficit severo na fotossíntese foram revertidos (Figura 8 A). As diferenças entre os genótipos na condutância estomática (g_s) foram mais pronunciadas nas plantas irrigadas e reirrigadas, sendo maiores no cultivar Embrapa 48 (Figura 8 B). Sob estresse moderado, apesar da fotossíntese ter sido maior no cultivar Embrapa 48, não foi detectada diferença em g_s mas a razão entre as concentrações interna e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) foi maior no cultivar BR 16 (Figuras 8 A, B e D). No estresse severo não houve

diferença na g_s , entretanto o cultivar tolerante apresentou menor C_i/C_a (Figuras 8 A, B e D). As taxas transpiratórias (E) foram reduzidas em ambos os cultivares quando da imposição do déficit hídrico (Figura 8 C). Na condição irrigada não houve diferença entre os cultivares, porém, nas plantas reirrigadas E foi significativamente maior no cultivar Embrapa 48 (Figura 8 C). A redução proporcional em E sob estresse hídrico progressivo foi sempre menor no cultivar Embrapa 48, contribuindo para que o mesmo tenha tido uma maior eficiência do uso da água instantânea (A/E) sob estresse severo (Figura 8 E). Em todos os tratamentos relação A/C_i (eficiência de carboxilação) é maior no cultivar Embrapa 48 (Figura 8 F). Com a imposição do déficit ocorreu uma redução progressiva nesta relação em ambos os cultivares nos déficits moderado e severo; recuperada em ambos cultivares após reidratação, sendo essa recuperação completa no cultivar BR 16 (Figura 8 F). Esse resultado evidencia uma maior eficiência de carboxilação do cultivar tolerante, associada a sua maior capacidade fotossintética (Figura 8 A).

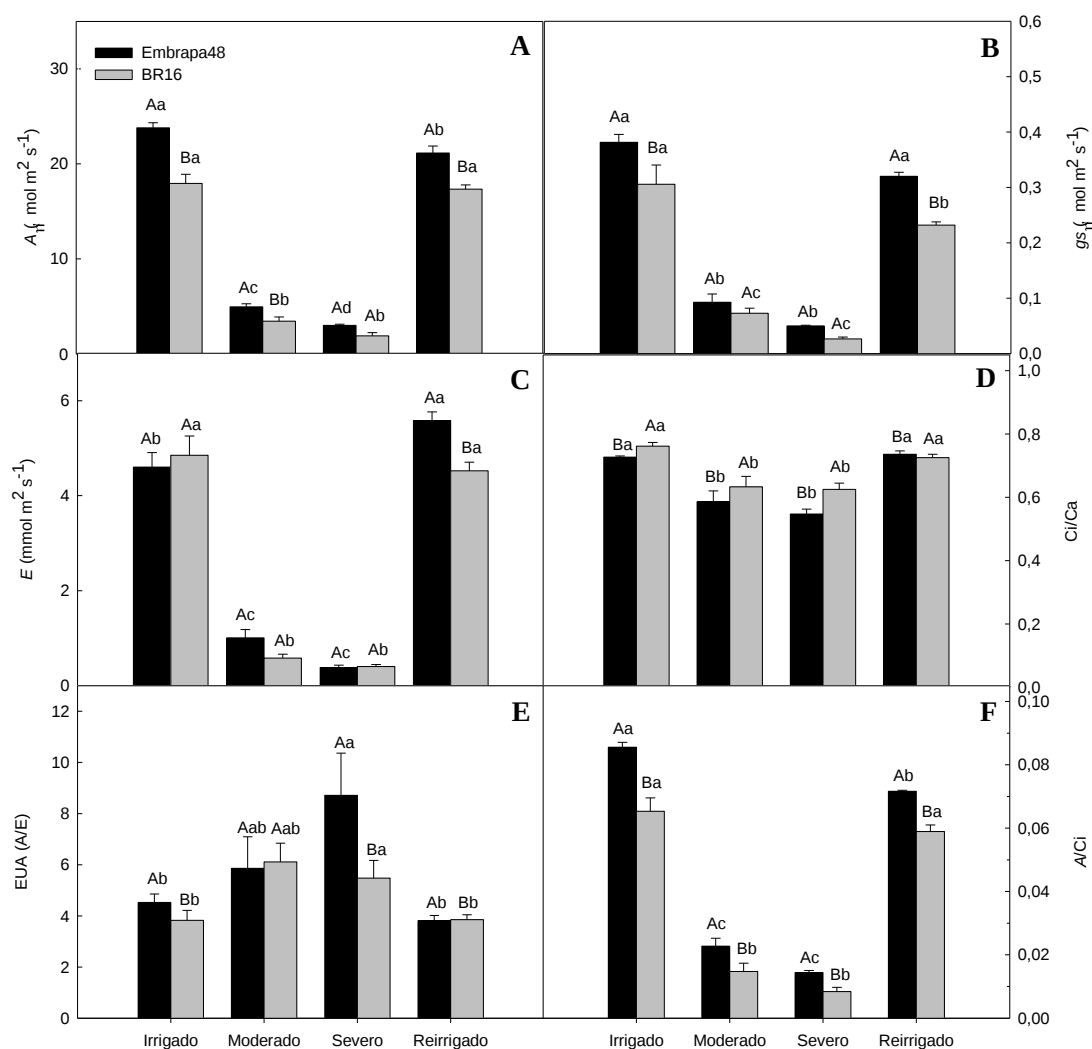


Figura 8. Efeito do déficit hídrico sobre a taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (B), taxa transpiratória (C), razão Ci/Ca (D), eficiência do uso da água (E) e razão A/Ci em cultivares de soja. (■) plantas tolerantes (Embrapa 48), (■) plantas sensíveis ao déficit hídrico (BR16). Os diferentes grupos correspondem aos tratamentos. Estatística segundo Figura 3.

Na presença de estresse hídrico, a taxa de transporte de elétrons (*ETR*) foi reduzida de forma proporcional com o nível de estresse em ambos os cultivares (Figura 9), sendo que o cultivar tolerante Embrapa 48 apresentou em todos os tratamentos uma maior *ETR*, inclusive no tratamento reirrigado (Figura 9).

Na ausência de estresse e sob déficit hídrico moderado, houve um paralelismo entre a redução da *A* e a *ETR*, de modo que o cultivar tolerante apresentou sempre as maiores taxas (Figura 9).

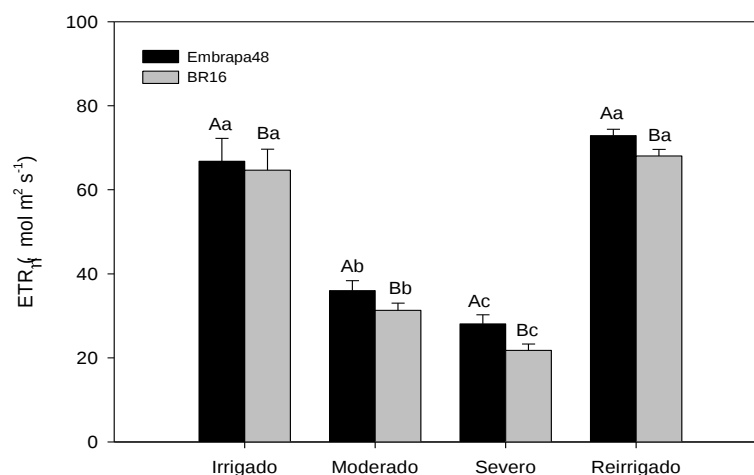


Figura 9. Efeito do déficit hídrico sobre a taxa de transporte de elétrons em cultivares de soja. (■) plantas tolerantes (Embrapa 48), (■) plantas sensíveis ao déficit hídrico (BR16). Os diferentes grupos correspondem aos tratamentos. Estatística segundo Figura 3.

Apesar do decréscimo em A em decorrência do déficit hídrico, não houve fotoinibição sob estresse moderado, visto que a eficiência fotoquímica potencial (razão F_v/F_m) e a eficiência fotoquímica efetiva do fotossistema II (Φ_{PSII}) mantiveram-se inalteradas (Figura 10 e 11 A), permanecendo similar às plantas controle, em ambos os cultivares. Já no estresse severo, observa-se uma redução em F_v/F_m no cultivar BR 16, indicando um possível dano fotoinibitório nesse cultivar (Figura 10).

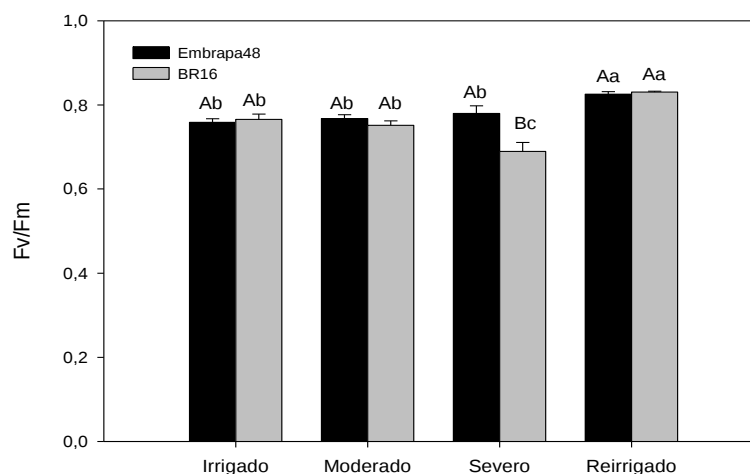


Figura 10. Efeito do déficit hídrico sobre a razão F_v/F_m em cultivares de soja. (■) plantas tolerantes (Embrapa 48), (■) plantas sensíveis ao déficit hídrico (BR16). Estatística segundo Figura 3.

O cultivar Embrapa 48 apresentou maior Φ_{PSII} em relação ao cultivar BR 16 em todos os tratamentos (Figura 11 A). A maior redução no Φ_{PSII} no cultivar sensível sob estresse hídrico é associada à redução em A (Figura 11 A), provavelmente devido a baixa disponibilidade de CO_2 em consequência da diminuição da g_s (Figura 11 B). O cultivar BR 16 apresentou maior coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ), na ausência de estresse. Já sob estresse foi observado um aumento de NPQ em ambos os cultivares, não havendo diferenças nos déficits tanto entre os cultivares, quanto nos tratamentos dentro de cada cultivar (Figura 11 B). Já para a fração de luz absorvida, que é utilizada na fase fotoquímica do FSII (P), o cultivar Embrapa 48 apresentou maiores valores em todos os tratamentos, fato também observado para a maior taxa de assimilação líquida de CO_2 neste cultivar. Houve uma retomada dos valores em plantas após retomada da irrigação, fato associado à recuperação observada para a A e ETR.

Sob estresse moderado, não foi observado diferenças significantes na fração de luz absorvida que não é dissipada termicamente e nem utilizada na fase fotoquímica do fotossistema II (PE) (Figura 11 D). Entretanto, houve um aumento de PE sob estresse hídrico severo somente no cultivar tolerante, o que se repetiu após a reirrigação. Analisando a fração de luz absorvida que é dissipada termicamente (D), houve um aumento em ambos cultivares somente sob estresse hídrico (Figura 11 E), mas sendo este aumento menor no cultivar tolerante Embrapa 48. Interessante notar que a reirrigação resultou em uma forte redução em D em ambos os genótipos, embora esta seja ainda menor do que valores observado no tratamento controle (Figura 11 E).

A fluorescência mínima em folhas adaptadas ao escuro (F_0) foi maior no cultivar BR 16 em todos os tratamentos (Figura 11 F). Assim como observado para D , a reirrigação resultou em uma forte redução em F_0 em ambos os cultivares, sendo esta menor do que observado no tratamento controle (Figura 11 F).

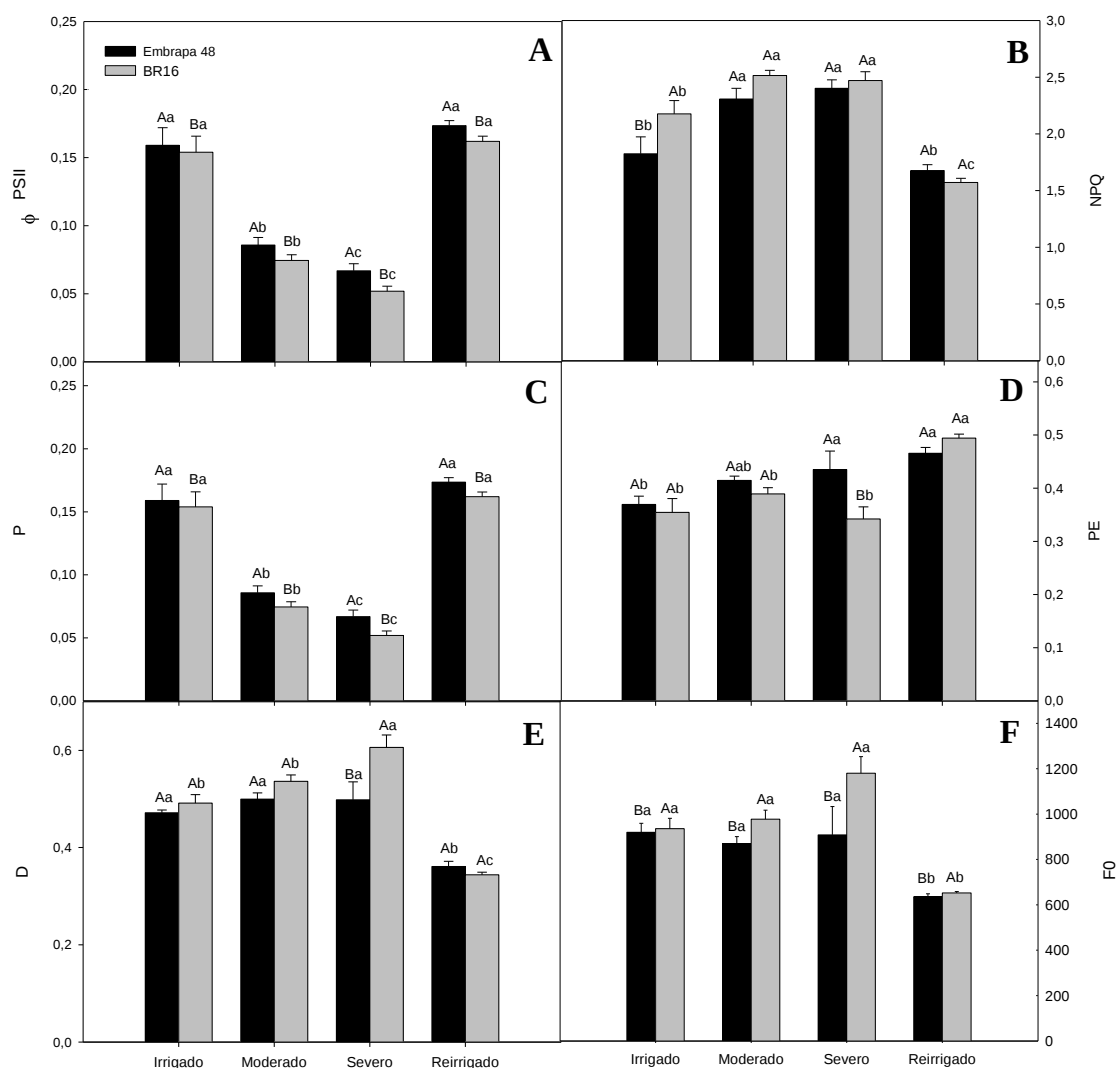
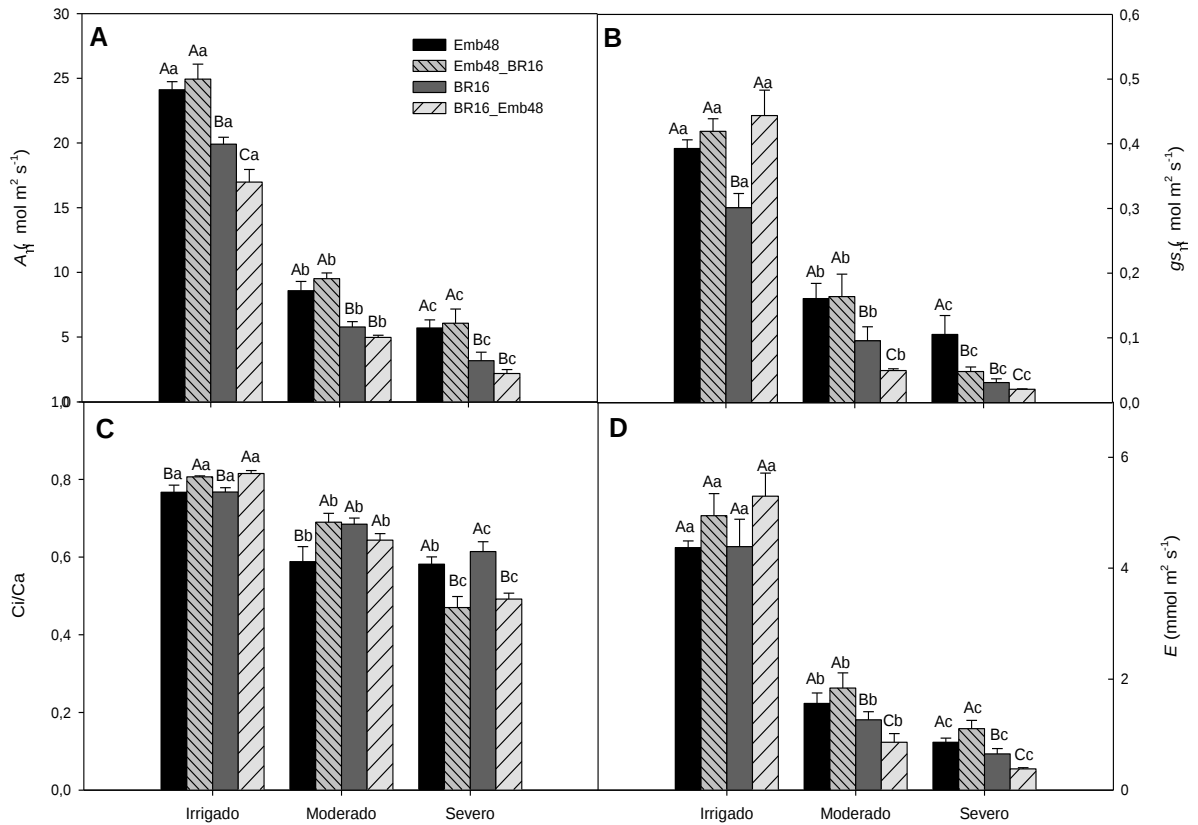


Figura 11. Efeito do déficit hídrico sobre o Φ PSII– rendimento quântico efetivo do FSII (A), NPQ– coeficiente de extinção não fotoquímica (B), P– fração da luz absorvida que é utilizada na fase fotoquímica do FSII (C), PE– fração da luz absorvida que não é dissipada termicamente e nem utilizada na fase fotoquímica do FSII (D), D– fração de luz absorvida que é dissipada termicamente (E) e F_0 – Fluorescência inicial (F) em cultivares de soja. (■) plantas tolerantes (Embrapa 48), (■) plantas sensíveis ao déficit hídrico (BR16). Estatística segundo Figura 3.

Com a finalidade de avaliar a influência do sistema radicular em mecanismos de tolerância à seca, foi realizado um experimento de enxertia recíproca. A enxertia foi realizada pelo método da garfagem, sendo obtidas plantas com sistema radicular do cultivar tolerante e parte aérea do cultivar sensível e vice e versa.

Na ausência de estresse, a A foi maior nas plantas com o sistema radicular do cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação às plantas com sistema radicular do cultivar

sensível (BR 16) e, sempre menor, em ambos cultivares na presença de estresse (Figura 12 A). Em contraste as plantas com sistema radicular do cultivar sensível apresentaram menores valores de A (Figura 12 A). Curiosamente, o genótipo tolerante enxertado no porta-enxerto sensível apresentou a maior redução na g_s em ambos níveis de estresse. Em contraste, o enxerto do cultivar BR16 no porta- enxerto do cultivar Embrapa 48, resultou em menor redução em sua g_s sob estresse hídrico moderado (Figura 12 B). Desta forma os resultados de g_s se correlacionam bem com os dados de A , entre os tratamentos, e indicam a importância do sistema radicular para as menores reduções em A e g_s em condições de limitada disponibilidade hídrica.



A importância do sistema radicular estende-se também aos efeitos observados nas reações fotoquímicas. O sistema radicular do genótipo tolerante provocou no enxerto do genótipo sensível uma maior ETR e Φ_{PSII} . Em contraste, as folhas do enxerto Embrapa 48 sob o porta-enxerto BR 16 tiveram as maiores reduções em ETR e Φ_{PSII} (Figura 13 e 14 B).

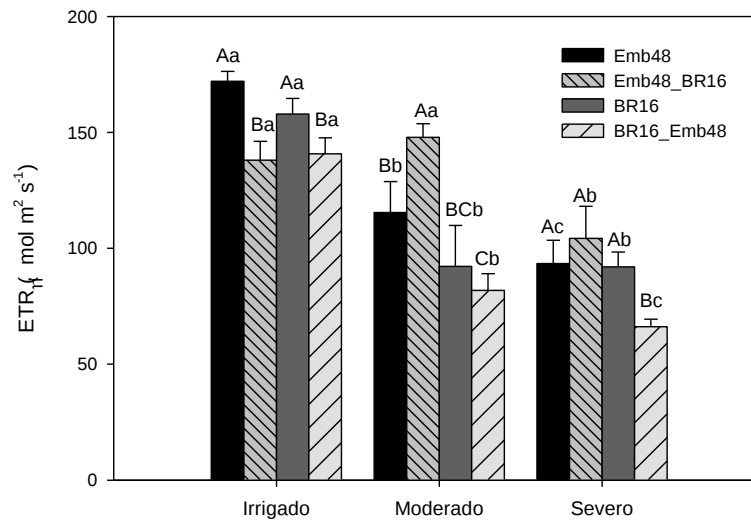


Figura 13. Efeito do déficit hídrico sobre a taxa de transporte elétrons (ETR) em cultivares de soja. Plantas com sistema radicular sensível não enxertado (BR 16); com sistema radicular sensível e parte aérea tolerante enxertado (BR16_Emb48); com sistema radicular tolerante não enxertado (Embrapa 48) e com sistema radicular tolerante e parte aérea sensível enxertado (Emb48_BR16). Estatística segundo figura 12.

Na ausência de estresse não foi observada diferença no NPQ em ambas as condições: enxertadas e não enxertadas. Já sob estresse foi observado um aumento de NPQ nas plantas não enxertadas, não havendo diferenças nos déficits tanto entre os cultivares, quanto nos tratamentos dentro de cada cultivar (Figura 14 C). Em contrapartida, nas plantas enxertadas sob déficit, as plantas com sistema radicular do cultivar tolerante apresentaram menores valores de NPQ (Figura 14 C).

Não foram observadas diferenças significantes na PE de plantas enxertadas de ambos cultivares (Figura 14 D). Entretanto, houve um aumento de PE sob estresse hídrico somente nas plantas enxertadas com sistema radicular do cultivar sensível (Figura 14 D). Analisando a D, houve um aumento em ambos cultivares nas plantas não enxertadas somente sob estresse hídrico, mas sendo este aumento menor no cultivar Embrapa 48. Já nas plantas enxertadas esse aumento foi menos expressivo (Figura 14 E).

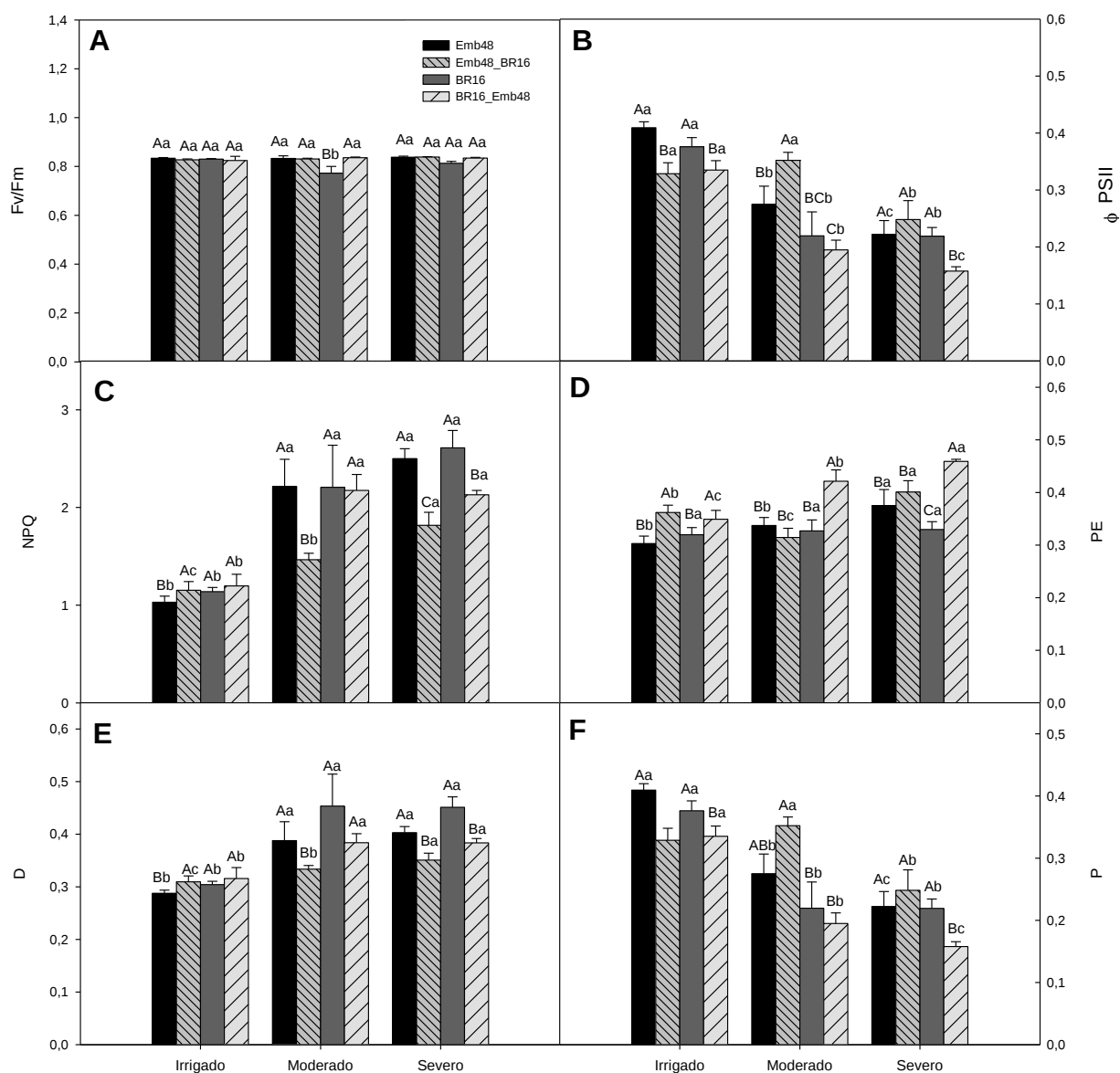


Figura 14. Efeito do déficit hídrico sobre a razão Fv/Fm (A), Φ_{PSII} – rendimento quântico efetivo do FSII (B), NPQ– coeficiente de extinção não fotoquímico (C), PE– fração da luz absorvida que não é dissipada termicamente e nem utilizada na fase fotoquímica do FSII (D), D– fração de luz absorvida que é dissipada termicamente (E) e P– fração da luz absorvida que é utilizada na fase fotoquímica do FSII (F) em cultivares de soja. Plantas com sistema radicular sensível não enxertado (BR 16); com sistema radicular sensível e parte aérea tolerante enxertado (BR16_Emb48); com sistema radicular tolerante não enxertado (Embrapa 48) e com sistema radicular tolerante e parte aérea sensível enxertado (Emb48_ BR16). Estatística segundo figura 12.

3.4 Danos celulares

Os danos celulares foram avaliados pela peroxidação de lipídeos através da quantificação do aldeído malônico (MDA) em folhas e raízes.

Nas folhas, a peroxidação lipídica aumentou em ambos os cultivares sob condições de déficit hídrico moderado e severo em comparação com os grupos controle (irrigado) de cada cultivar (Figura 15 A), e o cultivar sensível (BR 16) apresentou valores absolutos superiores ao tolerante (Embrapa 48) em todos os regimes hídricos (Figura 15 A). Embora para ambas as cultivares tenha havido uma redução no dano oxidativo no tratamento reirrigado, os valores foram ainda superiores ao tratamento controle em ambos os cultivares, indicando que não foi alcançada uma recuperação completa do dano oxidativo após 4 dias de reirrigação (Figura 15 A). Ao se analisar a peroxidação lipídica nas raízes, também observa-se aumentos gradativos com o aumento do estresse, mas sem diferenças entre os cultivares em todos os tratamentos (Figura 15 B). Entretanto, ao contrário das folhas, o dano oxidativo, após a reirrigação foi semelhante ao tratamento controle. Estes dados sugerem que pode haver, somente na folha, maior capacidade antioxidativa, ou menores níveis de agentes oxidantes no cultivar tolerante.

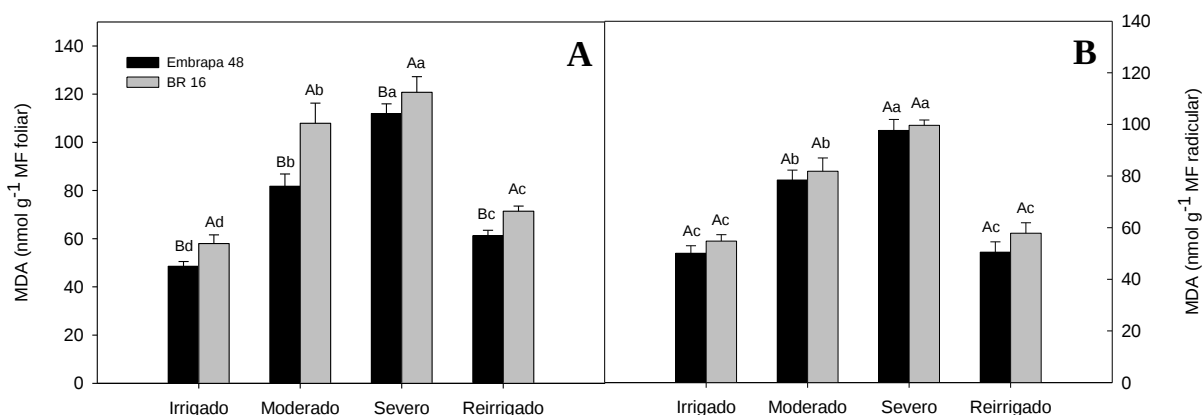


Figura 15. Efeito do déficit hídrico sobre a peroxidação de lipídeos em folha (A) e raiz (B) expressas em concentrações de aldeído malônico (MDA) em cultivares de soja. (■) plantas tolerantes (Embrapa 48), (■) plantas sensíveis ao déficit hídrico (BR16). Estatística segundo Figura 3.

3.5 Composição isotópica de ¹³C

A composição isotópica de ¹³C foi reduzida (valor mais negativo) apenas no cultivar Embrapa 48 no tratamento reirrigado, indicando que os estômatos desse cultivar e nessa condição encontravam-se mais abertos. Já nos déficits moderado e severo, o cultivar

Embrapa 48 apresenta maiores valores de composição isotópica de ^{13}C (valores menos negativos) em comparação com controle irrigado e com o tratamento reirrigado, indicando que o cultivar tolerante fecha mais eficientemente os estômatos quando sob déficit hídrico e abre mais os estômatos após a reirrigação (Figura 16). Esse comportamento não foi observado no cultivar BR 16, em que não foi detectado diferença em todos os tratamentos (Figura 16).

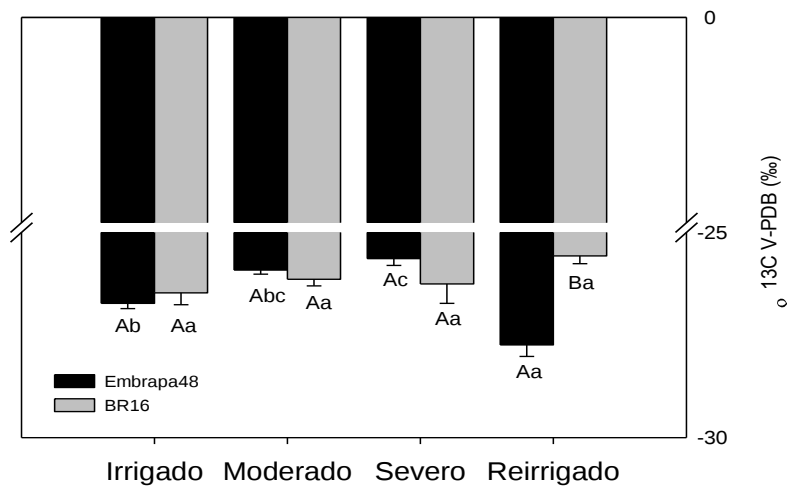


Figura 16. Composição isotópica de carbono em folhas das cultivares de soja. (■) plantas tolerantes (Embrapa 48), (■) plantas sensíveis ao déficit hídrico (BR16). Estatística segundo Figura 3.

3.6 Açúcares e amido

Os teores foliares de açúcares, glicose e frutose, apresentaram um aumento progressivo no cultivar Embrapa 48 ao longo do estresse, culminando com uma redução drástica no tratamento reirrigado, voltando aos níveis observados no controle irrigado (Figuras 17 A e C). Já no cultivar BR 16 houve um grande aumento apenas no déficit moderado, reduzindo no déficit severo, voltando a condição do controle no tratamento reirrigado. Os níveis de glicose e frutose na folha foram maiores no cultivar BR 16 tanto na ausência de estresse como sob estresse moderado. O contrário foi observado para o estresse hídrico severo, ou seja, maiores níveis de frutose e glicose foram observados no cultivar Embrapa 48. Já para a sacarose na folha também houve um aumento sob déficit hídrico severo em ambos os cultivares, fato não significativo estatisticamente sob estresse moderado (Figura 17 E). Para o amido observamos uma redução drástica na concentração somente na cultivar sensível sob estresse moderado, embora, sob estresse hídrico, ambas as cultivares

apresentassem níveis reduzidos semelhantes. A reirrigação não reestabeleceu os níveis de amido observados no tratamento irrigado, embora isto tenha sido observado para a sacarose e glicose (Figura 17 G e A). Provavelmente, em função do reestabelecimento em A, esse amido possa estar sendo utilizado para a manutenção/recuperação do crescimento.

Em raízes de soja sob seca, também observamos um aumento gradativo no teor de glicose no cultivar tolerante. No cultivar sensível, embora um aumento considerável no teor de glicose sob estresse moderado seja observado, não observamos incrementos com o aumento da desidratação (estresse severo). Os níveis de glicose em raízes foram menores somente no cultivar tolerante sob estresse moderado (Figura 17 B). Não observamos um aumentos gradativos de frutose nos teores em raízes com o aumento do estresse, visto que observamos grande aumento nos teores já sob estresse moderado, de forma semelhante em ambas as cultivar, sendo o mesmo observado sob estresse severo (Figura 17 D). Ao contrario da glicose, a reirrigação não reestabeleceu a frutose aos níveis observados no controle, sendo estes inferiores àqueles. O efeito do estresse nos teores de sacarose (Figura 17 F) foi muito semelhante ao observado para a glicose: aumento gradativo no teor de glicose no cultivar Embrapa 48, enquanto para o sensível, o aumento da deficiência hídrica observada entre o estresse moderado e severo não foi acompanhado por aumento no teor de sacarose neste órgão. Interessantemente, os níveis de sacarose na raiz foram maiores no cultivar tolerante no controle e em ambos os níveis de estresse, o que pode estar associado a maior fotossíntese neste cultivar (ausência do estresse e estresse moderado). Por outro lado, enquanto a reirrigação reestabelece os níveis de sacarose neste órgão no cultivar tolerante, os níveis de sacarose permanecem altos no genótipo BR 16, fato semelhante aquele observado para a glicose. Para o amido em raízes, não observamos nenhuma alteração sob diferentes níveis de estresse, mas foi sempre superior na cultivar BR 16 em todos os tratamentos (Figura 17 H), podendo esse fato estar relacionado também com a maior A da cultivar tolerante (ausência de estresse e estresse moderado).

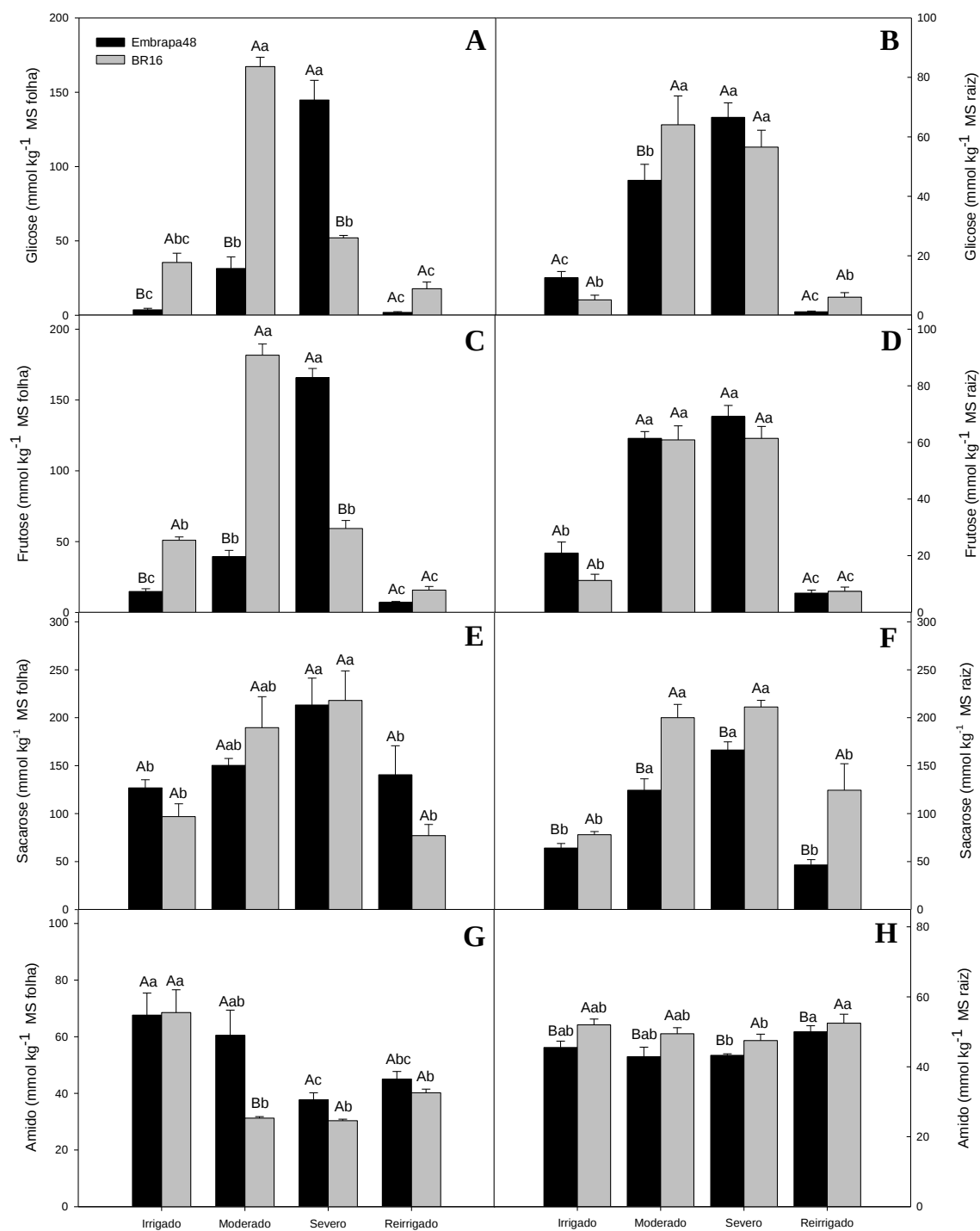


Figura 17. Teores de glicose em folha (A) e raiz (B), frutose em folha (C) e raiz (D), sacarose em folha (E) e raiz (F) e amido em folha (G) e raiz (H) em cultivares de soja sob déficit hídrico. (■) plantas tolerantes (Embrapa 48), (■) plantas sensíveis ao déficit hídrico (BR16). Estatística segundo Figura 3.

3.6 Ácido abscísico (ABA)

A concentração de ABA na folha aumentou cerca de 50 vezes sob déficit hídrico moderado e 40 vezes sob déficit severo no cultivar Embrapa 48. Já no cultivar BR 16, esse aumento foi de 15 vezes no déficit moderado e de 56 vezes sob estresse severo (Figura 13 A). É interessante ressaltar a intensidade do sinal no cultivar Embrapa 48 em relação ao cultivar BR 16 que é nove vezes maior no déficit moderado e duas vezes no déficit severo (Figura 18 A). No tratamento em que as plantas foram reirrigadas após alcançarem o déficit severo houve uma drástica redução no teor de ABA na folha, igualando-se ao grupo controle irrigado (Figura 18 A). Nas raízes os níveis de ABA foram cerca de 10 vezes menores. Embora um grande aumento tenha ocorrido em ambos os cultivares sob estresse hídrico, e tenha sido maior no cultivar Embrapa 48, os seus níveis foram semelhantes sob estresse hídrico severo, apresentando somente o cultivar sensível um aumento gradativo com o aumento da intensidade do estresse (Figura 18 B). Como observado em folhas a reirrigação causa uma redução drástica dos níveis de ABA, equivalendo-se agora aos observados no controle, e não diferindo entre os genótipos.

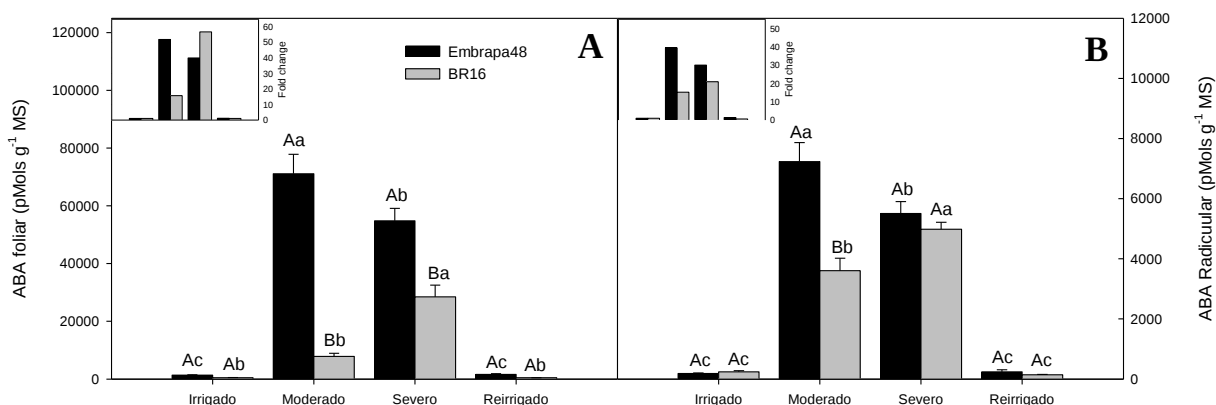


Figura 18. Concentração de ácido abscísico (ABA) em folha (A) e raiz (B) em cultivares de soja. (■) plantas tolerantes (Embrapa 48), (▒) plantas sensíveis ao déficit hídrico (BR16). Estatística segundo Figura 3.

A concentração de ácido abscísico (ABA) na seiva xilemática foi maior no cultivar tolerante em relação ao sensível em todos os tratamentos na condição não enxertada (Figura 19). Já nas plantas enxertadas primeiramente se observa que as plantas com enxerto tolerante permanecem, na ausência de estresse, com maiores níveis de ABA na seiva mesmo enxertadas no porta-enxerto sensível (Figura 19), indicando a importância da

síntese de ABA na folha nos níveis totais de ABA na seiva. Este mesmo fato pode ser observado pelos pequenos aumentos de ABA na seiva sob estresse hídrico. Sob estresse severo vemos que os níveis de ABA na seiva aumentaram no genótipo sensível quanto a enxertia foi feita no porta enxerto tolerante. Por outro lado mesmo tendo o sistema radicular do cultivar sensível, o qual tem menos ABA nas raízes sob estresse hídrico, possui os mesmos níveis de ABA na seiva do que o cultivar tolerante não enxertado, novamente indicando a contribuição do ABA sintetizado na folha para os níveis de ABA presentes na seiva.

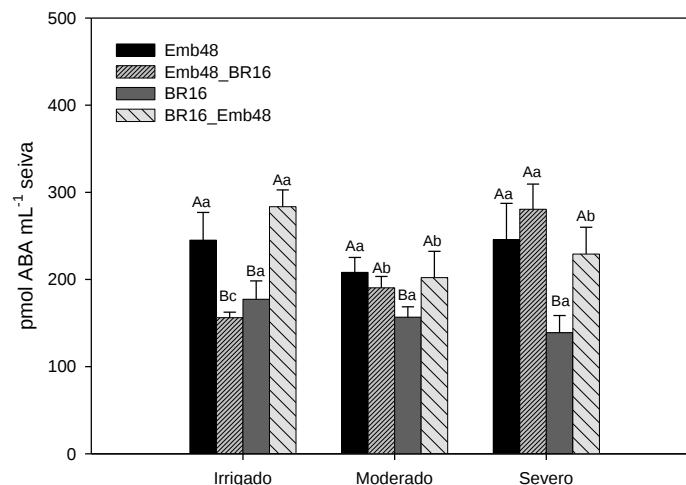


Figura 19. Concentração de Ácido abscísico (ABA) na seiva xilemática em cultivares de soja: com sistema radicular sensível não enxertado (BR 16); com sistema radicular sensível e parte aérea tolerante enxertado (BR16_Emb48); com sistema radicular tolerante não enxertado (Embrapa 48) e com sistema radicular tolerante e parte aérea sensível enxertado (Emb48_ BR16). Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças significativas entre médias de um mesmo tratamento em cultivares diferentes, e letras minúsculas denotam diferenças significativas entre médias dentro de um mesmo cultivar, (Tukey, $p < 0,05$). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão ($n=6$).

3.7 Perfil metabólico de folhas e raízes de cultivares tolerante e sensível submetidos à seca

Todos os resultados apresentados foram normalizados em relação ao tratamento controle do cultivar Embrapa 48, tendo este sempre o valor unitário (1).

Existem poucos relatos de estudos de perfil metabólico em folhas e raízes de soja, e quando se trata de seca, esses relatos chegam a ser inexistentes. Esse estudo de caracterização do perfil metabólico por GC-MS revelou não haver grandes diferenças qualitativas entre os metabólitos de folhas e raízes, exceto no que diz respeito à quantidade de metabólitos identificados, maior em folhas (59) que em raízes (46).

Em folhas, dos 59 metabólitos detectados 19 eram aminoácidos (Figura 20 D). No cultivar Embrapa 48 os aminoácidos leucina e isoleucina aumentaram significativamente com a severidade do déficit, sendo nesta condição cerca de 150 e 110 vezes maiores, respectivamente. Já o cultivar BR 16 apresentou também um aumento nesses aminoácidos ao longo do déficit, mas bem menor, quando comparados ao controle irrigado do cultivar Embrapa 48 (Figura 20 D). Da mesma forma, os aminoácidos prolina, valina, tirosina, triptofano, fenilalanina, metionina e asparagina também apresentaram aumentos em seus teores no cultivar tolerante sob estresse hídrico severo, mas com intensidade relativa menor (Figura 20 D). Por exemplo, o teor de prolina foi 67 vezes maior no cultivar tolerante sob estresse hídrico severo, e 31 vezes no cultivar sensível (Figura 20 D). Para todos estes aminoácidos que apresentaram aumento de seus teores no cultivar Embrapa 48, a reirrigação causou uma drástica redução em seus teores, os quais retornaram a valores semelhantes ao controle irrigado. Por outro lado, a concentração de GABA aumentou com a imposição do déficit de forma linear no cultivar Embrapa 48, enquanto que no BR 16 esse aumento foi significativo somente sob déficit severo (Figura 20 D), e a redução de seu nível no tratamento reirrigado ocorreu somente no cultivar Embrapa 48, não retornando aos níveis do controle irrigado.

Foram detectados 22 ácidos orgânicos em folhas. Destes, dez são intermediários do ciclo de Krebs (Figura 20 A e E). Observa-se que os ácidos orgânicos do cultivar tolerante que sofreram aumento na intensidade com a imposição do déficit são o oxalato, o malonato, o ácido ribônico, o ácido treônico e o ácido glucurônico. Os que sofreram redução com a imposição do déficit foram o glicerato, isocitrato e isoascorbato (Figura 20 A e B). Os demais ácidos orgânicos do cultivar tolerante não sofreram grandes variações na intensidade relativa em relação ao controle desse cultivar. Já para o cultivar BR 16 o único ácido orgânico em que ocorreu um aumento na intensidade relativa foi o isoascorbato sob estresse moderado, o contrário do observado para o cultivar tolerante, em paralelo as reduções na concentração de glicerato, isoascorbato, malato, piruvato e fumarato (Figura 20 A e B). Os demais não seguiram um padrão definido ou não sofreram grandes alterações.

Observa-se uma redução nos níveis de glicose-6-fosfato (G6P) na cultivar tolerante com a imposição do déficit hídrico severo e na cultivar sensível não houve alteração ao longo do estresse (Figura 20 F). Alguns polióis como xilitol e eritritol apresentaram um aumento significativo no cultivar tolerante quando submetido ao déficit hídrico severo,

enquanto no cultivar sensível, seus níveis permaneceram inalterados (figura 20 C). O mesmo comportamento foi observado para os compostos fenólicos, ácido ferúlico e ácido cafeico, intermediários da síntese de lignina e flavonóides (Figura 20 G).

Em condições de seca, os níveis de açúcares variaram consideravelmente entre os genótipos, por exemplo: glicose, frutose e allo-inositol aumentaram no genótipo sensível, mas não foram observadas alterações significativas no genótipo tolerante (Figura 20 B). Os conteúdos de myo-inositol não se alteraram nas folhas de ambos cultivares sob estresse (Figura 20 B).

Diferentes alterações nos níveis de polióis em folhas foram observadas entre os cultivares. Enquanto eritritol e xilitol aumentam seus níveis somente no genótipo tolerante sob estresse hídrico severo, os níveis de ononitol aumentam em ambos, nos dois níveis de estresse estudados, ao passo que os níveis de pinitol não são alterados (Figura 20 C).

Turanose, um análogo da sacarose, transportado pelos transportadores de sacarose das plantas, mas não metabolizado em plantas, teve um grande aumento dos seus níveis sob estresse moderado. Este aumento não foi observado no genótipo sensível, o qual já possui um maior nível deste metabólito na ausência do estresse hídrico (Figura 20 B).

Metabólitos que tiveram aumento dos seus níveis sob estresse e redução durante a reirrigação em pelo menos um dos genótipos em folhas, incluíram: dehidroascorbato, ribonato, treonato, glutarato, glicerato, frutose, glicose, turanose, eritritol, ononitol, xilitol, uma grande parte dos aminoácidos (isoleucina, fenilalanina, tirosina, valina, prolina, triptofano, leucina e gaba, glutamina, cisteína, glicina, treonina, glutamato, aspartato, asparagina), e alguns ácidos orgânicos do Ciclo de Krebs (oxalato, succinato e fumarato). No caso de metabólitos que tiveram redução sob estresse e aumento durante a reirrigação em pelo menos um dos genótipos em folhas, incluíram o dehidroascorbato e glicerato (ambos somente no genótipo tolerante).

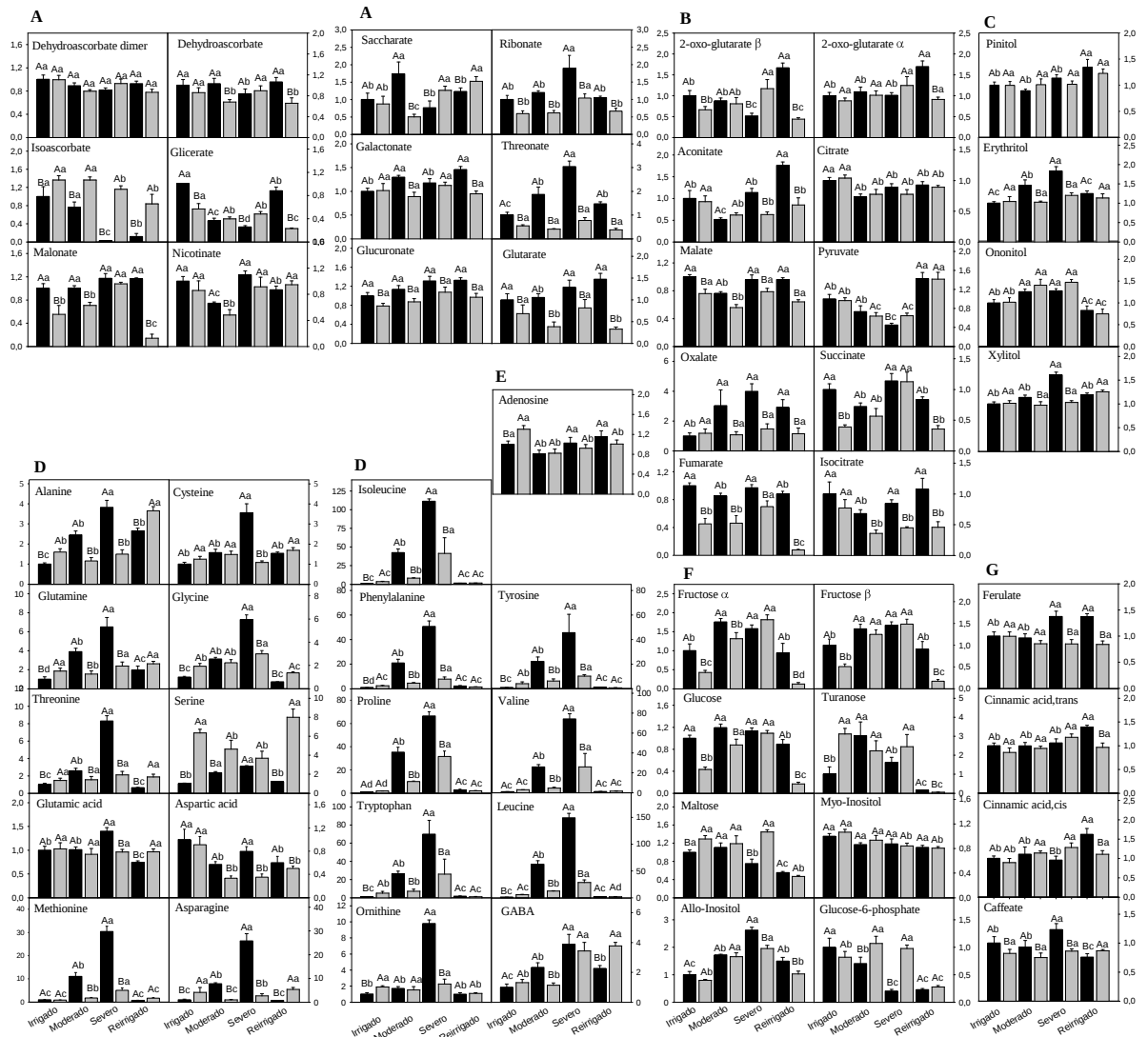


Figura 20. Perfil metabólico de folhas de soja sob diferentes níveis de déficit hídrico. (■) plantas tolerantes (Embrapa 48), (■) plantas sensíveis ao déficit hídrico (BR16). Conteúdos de metabólitos foram identificados e quantificados por GC-MS, e os seus valores relativos foram calculados em relação ao controle do cultivar tolerante. Os histogramas mostram as quantidades relativas de ácidos orgânicos (A), intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (B), polióis (C), aminoácidos (D), nucleotídeo (E), açúcares, álcoois- açúcares e açúcar fosfatado (F) e compostos fenólicos (G). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão (n=5). Estatística segundo figura 3.

Em raízes, dos 46 metabólitos detectados, 17 eram aminoácidos, compreendendo as classes: essenciais, não essenciais e condicionalmente essenciais (Figura 21 D). Foram detectados apenas 14 ácidos orgânicos em raízes (Figura 15 A). Destes, oito são intermediários do ciclo de Krebs (Figura 21 B).

Primeiramente observamos que as raízes do genótipo sensível diferem bastante do cultivar tolerante na ausência do estresse, contendo um maior nível de ácidos orgânicos e alguns açúcares, como os maiores níveis de galactarato, sacarato, treonato, ribonato,

valerato, aconitato, citrato, fumarato, oxoglutarato, malato, piruvato, oxalacetato, frutose e glicose (Figuras 21 A e E). Este resultado também foi observado para alguns aminoácidos e seus derivados, como serina, treonina, glutamato, aspartato, cadaverina, e fenilalanina (Figura 21 D). Uma parte significativa destes compostos com maiores níveis no cultivar sensível tiveram reduções em pelo menos um dos níveis de estresse, somente no cultivar sensível, como galactarato, aconitato, citrato, oxoglutarato, piruvato, succinato, oxalato, cadaverina, a maioria dos ácidos orgânicos, que não foi observado para os aminoácidos serina, treonina, glutamato, aspartato, cadaverina, e fenilalanina. A maioria destas reduções foi mais expressiva no cultivar BR 16.

Aumento na concentração com a presença do estresse foi observado para frutose e glicose (mais pronunciados no genótipo tolerante, e para ambos, sob estresse moderado), trehalose (gradual sob estresse em ambos os genótipos), xilose, mio-inositol, alanina e asparagina (graduais no cultivar tolerante), prolina, serina, treonina, isoleucina (graduais em ambos genótipos, mais sempre maiores no tolerante) (Figuras 21 D e E). A mudança mais notável foi observada para a prolina que aumentou 236 vezes no cultivar tolerante e apenas 73 vezes no cultivar sensível quando submetidos a déficit severo (Figura 21 D).

Metabólitos que tiveram redução com o estresse em pelo menos um dos genótipos incluíram o sacarato, treonato, glicose-6-P, xilitol e cadaverina.

Vários polióis aumentaram seus níveis sob estresse como ononitol. Inositóis aumentaram somente no cultivar sensível, enquanto os níveis de pinitol aumentaram em ambos os genótipos, aumento revertido com a reirrigação. Os níveis de xilitol reduziram-se somente no cultivar sensível (figura 21 C). Observa-se uma redução na glicose-6-fosfato nos dois cultivares com a imposição do déficit (Figura 21 E).

Alterações metabólicas observadas na seca foram completamente revertidas com a reirrigação nos dois genótipos, e incluíram a frutose, glicose, oxoglutarato, rafinose, ribonato, xilose, asparagina, prolina, serina, treonina, valina, tirosina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina e piruvato, todos para ambos os genótipos. Já com outros metabólitos, esta reversão foi limitada a somente um genótipo, como aloinositol, alanina, glicose-6-P, fumarato, oxalato, valerato, cadaverina e glicose-6-P. Metabólitos com esta simetria de resposta são candidatos a terem seu metabolismo associado com a aclimação ou tolerância ao déficit hídrico.

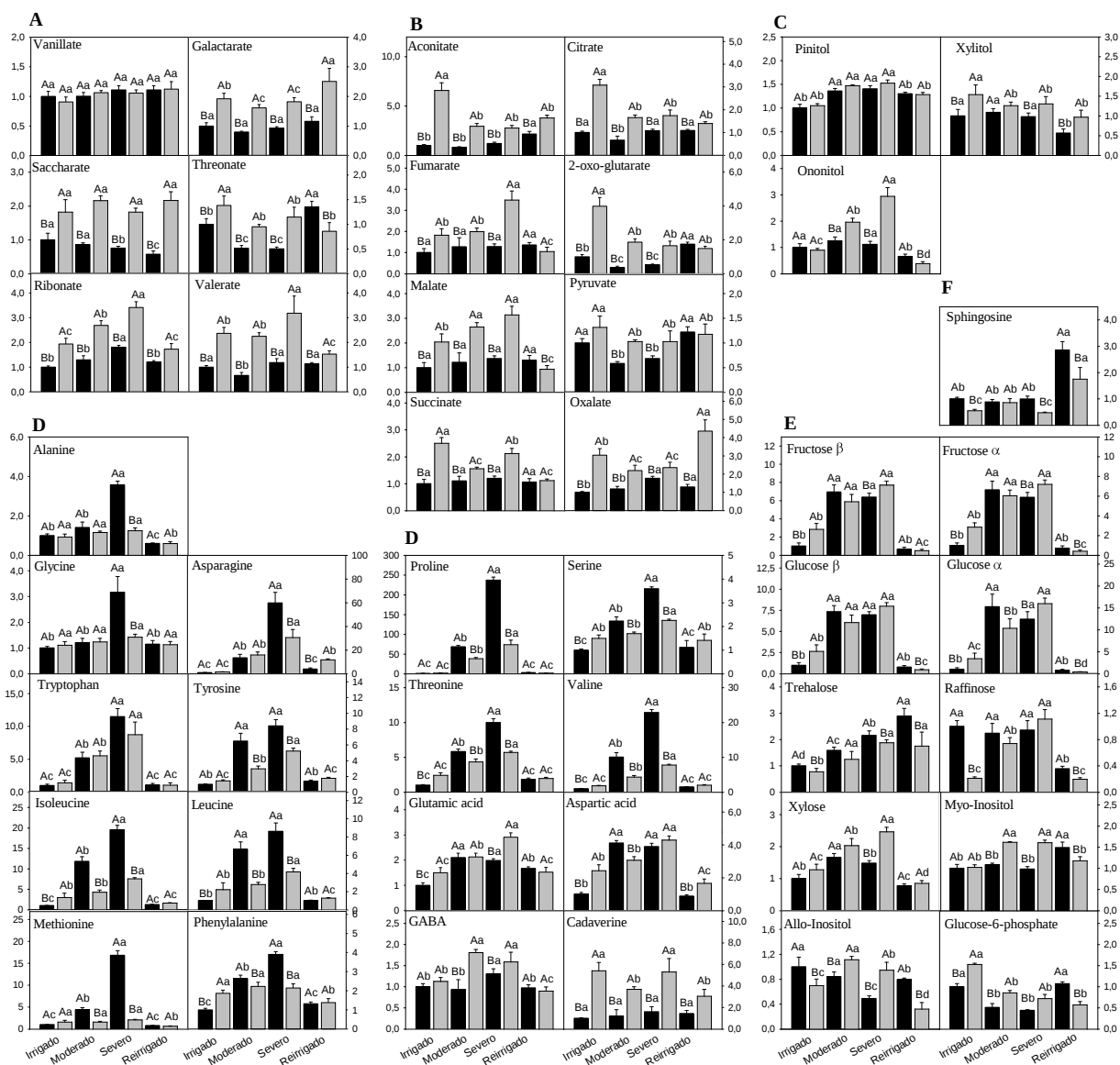


Figura 21. Perfis metabólicos de raízes de soja ao longo do déficit hídrico. (■) plantas tolerantes (Embrapa 48), (▒) plantas sensíveis ao déficit hídrico (BR16). Conteúdos de metabólitos foram identificados e quantificados por GC-MS, e os seus valores relativos foram calculados em relação ao controle do cultivar tolerante. Os histogramas mostram as quantidades relativas de ácidos orgânicos (A), intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (B), polióis (C), aminoácidos (D), açúcares, álcoois-açúcares e açúcar fosfatado (E), metabolito de ácidos graxos (F). Os dados representam a média $\pm$ erro padrão (n=5). Estatística segundo figura 3.

Estes metabólitos identificados representam inúmeras rotas metabólicas e fotoassimilados envolvidos na biossíntese e degradação, incluindo processos como a biossíntese de amido (e.g. hexoses e metabólitos fosforilados), quebra do amido (e.g. maltose), intermediários do ciclo de Krebs, compostos fenólicos, dentre outros. A identificação de ciclitóis (e.g. pinitol e inositol) sugere também ocorrência de ajustamento

osmótico e na proteção de danos oxidativos em resposta à seca. Observamos, também, a presença de compostos, tais como o ácido ribônico, que é considerado como fração intermediária de vias específicas, tais como a biossíntese de alcalóides. Assim, de um ponto de vista sintetizador, a abordagem de perfil metabólico é capaz de rapidamente e com precisão identificar diversas alterações metabólicas e os resultados podem contribuir para compreender processos fisiológicos que atuam como uma resposta a alterações no desenvolvimento, na genética e/ou mudanças ambientais (Lange 2006; Weckwerth & Fiehn 2002).

4. DISCUSSÃO

Em plantas, a tolerância ou sensibilidade ao estresse hídrico depende da espécie e do genótipo em estudo, da duração e severidade do déficit, bem como da fase de desenvolvimento da cultura. Lima et al., (2008), baseados em dados de produtividade, concluíram que o cultivar Embrapa 48 é um genótipo tolerante ao déficit hídrico. Entretanto nenhum estudo fisiológico foi publicado a este respeito, de forma a confirmar este fenótipo e a descrever os mecanismos de tolerância envolvidos. Registre-se aqui que a maioria das variáveis analisadas neste trabalho indica a participação de diferentes respostas relacionadas à tolerância à seca.

Em primeiro lugar, a curva de desidratação mostrou que o cultivar Embrapa 48 retardou a desidratação nos diferentes níveis de déficit hídrico. Entretanto, a condutância estomática nos dois níveis de estresse não foi menor, e não há diferenças na área foliar entre as cultivares em nenhum dos tratamentos. Na ausência do estresse, o cultivar tolerante tem um menor potencial hídrico foliar na antemanhã, o que pode ser explicada, especificamente nesta situação, pela maior condutância estomática. Esta ausência de correlação entre diferenças na condutância e aquelas observadas para a curva de desidratação pode ser explicada por duas hipóteses. A primeira tem como argumento que foi determinado g_s em um momento que não haveria diferença na condutância entre os genótipos, em outros momentos, como nas horas mais quentes do dia, haveria uma menor condutância no cultivar 48. Esta hipótese pode ser descartada, devido a não haver diferenças na discriminação isotópica entre os genótipos sob seca, visto que mesmo tendo o genótipo tolerante maior fotossíntese, e condutância estomática semelhante, possuía a mesma composição de carbono pesado (^{13}C). A segunda hipótese se basearia no argumento de que o genótipo tolerante possuiria maior condutividade hidráulica. Embora não medida diretamente, podemos inferir que isto é possivelmente verdade, considerando que o cultivar Embrapa 48 possui maior volume radicular sob estresse hídrico, e mesmo na ausência deste, podendo assim ser mais eficiente em absorver água em um solo com deficiência hídrica. Esta maior condutância poderia explicar a maior A/E que este cultivar apresenta na ausência e sob estresse hídrico severo. O tratamento de reirrigação também mostra interessantes resultados, visto que embora o potencial hídrico volte a normalidade nos dois cultivares, a condutância só volta aos valores semelhantes ao controle no cultivar tolerante, sendo maior neste.

O gradual decréscimo da fotossíntese (até cinco vezes o observado no controle) foi menor no cultivar tolerante sob déficit moderado, apesar de não haver entre eles diferenças na condutância, o que pode indicar inibição da fase bioquímica ou fotoquímica mais acentuada no genótipo sensível. De fato, a eficiência de carboxilação, que teve forte redução com a seca, foi sempre maior no cultivar tolerante, em todos os tratamentos, mesmo não diferindo do tolerante, nestes dois tratamentos, na sua condutância estomática (g_s). Outra evidência sugerindo a participação de um evento não estomático na tolerância à seca é a análise simultânea da razão C_i/C_a e g_s . Apesar da ausência de diferenças quanto a g_s em ambos os níveis de estresse, observa-se menor C_i/C_a no tolerante, mesmo embora a fotossíntese líquida não difira entre eles no estresse severo.

A contribuição das reações fotoquímicas na fotossíntese para a tolerância diferencial destes genótipos a seca pode ser vista na maior ETR e $\Phi PSII$ do genótipo tolerante em ambos os níveis de estresse, mesmo quando não há diferença em g_s . A maior ETR e $\Phi PSII$ em ambos os níveis de estresse pode ser explicada pela maior P. Entretanto, temos mais uma diferença nas reações fotoquímicas entre os genótipos: sob estresse severo o cultivar sensível tem maior fração de luz dissipada termicamente, enquanto nesta mesma situação, o cultivar tolerante apresenta maior fração de luz nem dissipada termicamente (D), nem aproveitada nas reações fotoquímicas (PE; $PE=P-D$). Maior PE pode tentativamente ser explicada por um maior fluxo de elétrons no transporte cíclico nos tilacóides, enquanto o maior D, mesmo com menor taxa de transporte de elétrons no sensível, indica um mecanismo de defesa e uma redução da eficiência das reações fotoquímicas, como sugerido pelo maior nível de dano oxidativo neste genótipo. Esta análise conjunta dos dados de fluorescência indica que há uma contribuição clara das reações fotoquímicas na tolerância à seca.

A maior tolerância à seca do genótipo Embrapa 48 também pode ser vista nas magnitudes do dano oxidativo (peroxidação de lipídeos) sob déficit hídrico. Embora haja, em ambos os genótipos, aumento do dano com a seca, ele sempre foi maior em folhas do tolerante em todos os tratamentos. É sabido que a reirrigação pode representar um momento em que o estresse oxidativo seja maior ainda do que observado sob estresse hídrico severo (Bartels & Sunkar, 2007), sendo a avaliação das respostas a esta situação muito útil para ilustrar outros mecanismos de tolerância que atuam especificamente nesta fase de resposta das plantas. O fato de ambos os genótipos terem ainda um nível de peroxidação de lipídeos maior que o tratamento controle, indica que aos quatro dias de reirrigação ainda não houve uma total recuperação dos danos da seca.

O maior nível de danos oxidativos em folha no cultivar sensível pode ser tanto a causa de sua menor eficiência fotoquímica, e/ou a sua consequência, mas não temos evidências para responder esta questão envolvida.

O estresse hídrico também aumentou a peroxidação de lipídeos em raízes, mas de forma indistinta entre os genótipos, os quais também não diferiram após a reirrigação. Os danos oxidativos foram ligeiramente inferiores àqueles observados em folhas. Estes fatos sugerem que a tolerância à seca pode também ter uma contribuição dos mecanismos antioxidativos nas folhas, mas não nas raízes, pelo menos nestes genótipos estudados. Aumento de MDA com o déficit e recuperação com a reirrigação também foi observado por Iftekhhar et al. (2010) em estudo proteômico em raízes com apenas uma cultivar de soja.

Maior tolerância das plantas a baixa disponibilidade hídrica é atribuída ao acúmulo de açúcares solúveis em tecidos sob restrição hídrica (McManus et al., 2000), atuando como osmoprotetores (Ingram & Bartels, 1996; Sanchez et al., 1998). Neste nosso trabalho observamos claramente que o estresse levou a um aumento de açúcares e aminoácidos com o estresse, mas a resposta foi diferente entre os genótipos. A análise do perfil metabólico e dos açúcares permite obter várias evidências indiretas de que o ajuste osmótico é um mecanismo que contribui para a tolerância diferencial dos cultivares. Observa-se que, embora o aumento de sacarose seja semelhante em ambos os genótipos sob estresse hídrico, os níveis de frutose e glicose foram maiores no cultivar tolerante. Isto pode indicar uma maior atividade da invertase ácida no vacúolo. É curioso o fato que o inverso seja visto no estresse moderado, e isto poderia ser explicado pela menor capacidade de sustentar este ajuste osmótico sob o déficit hídrico severo uma vez que a fotossíntese líquida foi menor no estresse moderado, e que este genótipo seja o único que apresentou uma redução no teor de amido, a qual foi alta (em torno de 45 %). No estresse severo o cultivar sensível não apresentou alteração nos teores de amido, comparado com o cultivar tolerante, o qual teve uma redução em torno de 35 % neste nível de estresse, o que poderia explicar os maiores níveis de frutose e glicose. Outra explicação para esta diferença no acúmulo de açúcares sob estresse hídrico severo é o fato de que maltose, um dos produtos da degradação de amido, seja maior no cultivar sensível nestas condições. Esta aparente contradição entre não alternância nos níveis de amido e aumento nos níveis de maltose no cultivar sensível pode indicar uma maior inibição da respiração em folhas no mesmo, argumento que também pode ser sustentado pelos maiores níveis de glicose-6P em ambos os níveis de estresse.

Nas raízes, os efeitos da seca são diferentes. Embora também tenha aumento nos teores de sacarose, frutose e glicose, as concentrações destas hexoses não difere entre os genótipos sob estresse, ao passo que o teor de sacarose tenha sido sempre maior no cultivar sensível, em todos os tratamentos. Neste caso esperaríamos que o aumento da atividade da invertase ácida vacuolar fosse observado somente nas folhas. Adicionalmente, podemos sugerir que o fluxo respiratório em raízes seria menor no genótipo sensível. Outras evidências que suportariam este argumento seria também o maior teor de glicose-6P em raízes (igual ao observado em folhas), e o claro e maior acúmulo de ácidos orgânicos intermediários da glicólise e Ciclo de Krebs (maiores níveis de aconitato, citrato, fumarato, oxoglutarato, malato, piruvato, succinato, e oxalacetato). Uma maior redução da respiração pode comprometer o crescimento radicular, e observamos que sob seca, o cultivar sensível tem também um menor crescimento radicular em resposta à seca, suportando adicionalmente esta hipótese. Ao contrário da folha, o estresse não altera os níveis de amido em raízes, e o genótipo sensível sempre teve um maior teor de amido neste órgão em todos os tratamentos. Estes menores teores de amido podem representar uma maior taxa respiratória intrínseca (como na ausência do estresse) do cultivar tolerante, uma vez que o mesmo possui um maior volume radicular em todos os tratamentos, e que o ajuste osmótico também foi maior em raízes, devido ao aumento de osmólitos compatíveis, visto que os aumentos nos níveis da maior parte dos aminoácidos foi maior no cultivar tolerante sob seca (alanina, glicina, asparagina, prolina, serina, triptofano, tirosina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, treonina). Este ajuste osmótico representa um gasto extra de energia, visto que os mesmos precisam ser acumulados no vacúolo e transportados contra um gradiente de concentração.

A importância da reirrigação para obter evidências adicionais capazes de sustentar a importância das mudanças metabólicas nos mecanismos de tolerância e aclimação é clara, tanto em folhas como em raízes. Primeiramente, os aumentos em glicose e frutose sob seca são revertidos em ambos os genótipos, e no caso da sacarose, somente revertido no genótipo tolerante. Esta diferença entre os genótipos para a sacarose, poderia ser a menor respiração foliar do genótipo BR 16, já suposta anteriormente, permaneceria somente neste cultivar durante os quatro dias de reirrigação. Reversibilidade total do aumento de vários aminoácidos foi observada em folhas (isoleucina, tirosina, fenilalanina, prolina, valina, triptofano, leucina, asparagina, metionina), e em raízes (alanina, glicina, asparagina, triptofano, tirosina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, valina, glutamato e aspartato). Estes

dados são evidências adicionais para sustentar o argumento de que ajuste osmótico conferido pelo acúmulo de aminoácidos é uma importante resposta à seca em folhas, e mais importante ainda em raízes, visto que não houve diferenças entre os cultivares para os teores de hexoses. Como a maioria destes aumentos nos teores osmóticos foram maiores, em ambos os órgãos, no cultivar Embrapa 48, os dados indicam que o ajuste osmótico foi maior neste genótipo, e que o acúmulo de aminoácidos foi devido a maior síntese de aminoácidos do que a degradação dos mesmos.

Os maiores níveis de eritritol e xilitol no cultivar tolerante em folhas sob estresse, e do ononitol em raízes do genótipo sensível, sugere que o metabolismo dos álcoois-açúcares possa contribuir para a tolerância à seca em soja. O fato de que o genótipo sensível teve maiores níveis de ononitol sob seca e menores de eritritol e xilitol nas folhas indica que claras diferenças no metabolismo destes compostos existam entre os genótipos. Os polióis são importantes para aumentar a mobilidade de nutrientes, como o do boro, essencial para sustentar o crescimento das raízes sob seca (Matiello et al, 2010), bem como serem importantes compostos antioxidativos (Kranner & Birtic, 2005; Williamson et al., 2002).

O aumento com a seca de alguns metabólitos pode levar a sinalização afetando, assim, o desenvolvimento e a fotossíntese. Primeiramente seriam a glicose e frutose, os quais seriam então prontamente fosforilados gerando um sinal através da percepção do aumento da atividade da hexocinase, reduzindo a transcrição de vários genes do Ciclo de Calvin (Dai et al., 1999). A hexocinase é uma enzima essencialmente citosólica. Se a glicose esta sendo produzida basicamente a partir da sacarose pela invertase ácida, ela não esta sendo produzida no citosol e sim no vacúolo. Entretanto, a glicose também pode ser oriunda da degradação do amido, e então, um aumento de seu fluxo através da hexocinase poderia gerar um sinal. Tomados em conjunto, a redução nos teores de amido e o aumento dos teores de glicose, vamos detectar uma concordância: sob estresse moderado, maior degradação de amido e maior aumento da glicose no sensível; sob estresse severo, menor degradação de amido e maior aumento da glicose são observados no cultivar tolerante. Se a sinalização associada à hexocinase fosse paralela às alterações no teor de glicose esperar-se-ia um maior efeito inibitório sob estresse severo no cultivar tolerante, o que não foi observado. Esta diferença poderia ser explicada pelo efeito sinalizador da hexocinase sendo testado com adição exógena de altos níveis de glicose (2-6 % do meio de cultivo) e principalmente após a germinação, com o início da fotossíntese nas plântulas jovens. Os níveis de glicose tanto em folhas como raízes foram na faixa de mmol/kg de MS, e maiores em folhas o que poderia estar

muito abaixo do suficiente para gerar um sinal ou alternativamente, um sinal muito fraco, frente a outros eventos em resposta à seca como fechamento estomático, redução na taxa de transporte de elétrons ou dano oxidativo. O segundo metabólito, trehalose é um dissacarídeo, metabólito protetor, mas também o seu metabolismo, gerando trehalose-6P (T6P), que é um metabólito que pode afetar vários aspectos do metabolismo e desenvolvimento, cujo papel ainda não é bem compreendido (Matthew, 2008). Houve um aumento de trehalose em raízes sob seca, o qual foi levemente maior sob estresse hídrico no cultivar tolerante. Poderíamos deduzir que haveria também um maior aumento de T6P neste cultivar e órgão. Entretanto os efeitos conhecidos deste metabólito são em folhas ou plântulas, e pouco se sabe sobre seus efeitos em raízes (Eveland & Jakson, 2012). Maiores níveis de T6P, se ocorressem em folhas, poderiam contribuir para explicar a maior fotossíntese líquida em folhas (Lunn et al., 2006), mas como não detectamos trehalose em folhas e nada se sabe sobre seu transporte em plantas, não podemos concluir que isto estaria ocorrendo durante o estresse hídrico em soja. O terceiro metabólito potencialmente sinalizador é a turanose, cujo papel e biossíntese em plantas é desconhecido (Gonzali et al., 2005). Aplicação exógena deste metabólito causa severa redução do crescimento promovida por um fator transcricional que é expresso no meristema apical das raízes (Gonzali et al., 2005). Os níveis de turanose aumentaram em folhas com a seca e retornaram ao normal com a reirrigação de modo indistinto entre os cultivares. Desta forma não contribuiria para a tolerância diferencial a seca.

A resposta à seca é claramente relacionada ao aumento nos níveis de ABA em ambos os genótipo e níveis de estresse em folhas, e foram maiores no cultivar tolerante. Este aumento com o estresse foi também observado na raiz, mas somente sob estresse moderado foi maior no genótipo tolerante. Seus níveis em ambos os órgãos voltam a níveis normais (tratamento controle) com a reirrigação. Os aumentos em ABA sob déficit hídrico se correlacionaram com alterações na composição isotópica de ^{13}C e g_s no cultivar tolerante sob estresse. Porém essas diferenças não foram observadas no cultivar sensível, não sendo verificada diferença na composição isotópica do ^{13}C nesse cultivar. Essa ausência de diferença na composição isotópica pode ser explicada pelo menor teor de ABA no sensível nas condições de déficit. No entanto, apesar da grande diferença entre os dois cultivares no teor de ABA sob déficit, não foi possível verificar alteração na composição isotópica de ^{13}C nem em g_s . Adicionalmente, é possível que estas mudanças em ABA possam afetar outros mecanismos envolvidos na tolerância à seca, como na ativação do mecanismo oxidativo, visto que os maiores níveis de ABA se

correlacionam bem com o menor dano oxidativo em folhas (Zhang et al., 2006), ambos os efeitos mais notórios no cultivar tolerante.

Os dados de crescimento demonstram que a indução do crescimento radicular é maior sob seca no cultivar tolerante, o que ocorre às expensas da redução do crescimento relativo da parte aérea, sem afetar contudo, a AF. Embora o NF seja maior em todos os tratamentos no cultivar tolerante, as folhas são maiores no cultivar sensível, não alterando assim, a AF. Isto evidencia uma menor alocação para o crescimento do caule, sem causar, reduções no crescimento, redução na A, e ocasionando uma maior alocação de carbono para o crescimento radicular, o que é sustentado também pelas alterações discutidas nos metabólitos respiratórios (e também pelos dados de proteoma a serem apresentados no capítulo 2).

A enxertia recíproca demonstrou que os níveis de ABA não se correlacionam com as mudanças em g_s . Os dados de enxertia recíproca sustentam a importância da condutividade hidráulica na tolerância à seca. Mesmo utilizando como enxerto o genótipo sensível, o sistema radicular do cultivar tolerante ocasionou menores reduções em A, maiores ETR, P e g_s . Por outro lado, a utilização do genótipo tolerante como o enxerto sob o sistema radicular do sensível teve as maiores reduções observadas em A, g_s , ETR e P. Esta clara simetria indica o sistema radicular como um dos principais fatores determinantes da maior tolerância observada em plantas do genótipo Embrapa 48.

5. CONCLUSÕES

Em síntese, este trabalho indica a contribuição de diferentes mecanismos para a tolerância à seca em soja. Em primeiro lugar, observamos a postergação da desidratação hídrica, não relacionada a alterações em g_s ou a composição isotópica do ^{13}C , o que sugere a importância na condutividade hidráulica nesta tolerância, e a uma maior indução do crescimento radicular sob deficiência hídrica. Este maior crescimento, associado a várias mudanças metabólicas, sugerem maior respiração nas raízes do cultivar tolerante. Em segundo lugar, uma menor inibição das reações fotoquímicas no cultivar tolerante poderia explicar, ao menos parcialmente, a maior fotossíntese deste genótipo, sob estresse moderado. Em terceiro lugar, o menor dano oxidativo em folhas do cultivar tolerante pode significar uma maior atividade do sistema antioxidativo, ou uma menor geração de radicais livres, cuja importância relativa ainda não pode ser determinada com base nos nossos dados. Em quarto lugar, a análise do perfil metabólico permitiu identificar um maior ajustamento osmótico associado a hexoses e aminoácidos, o qual é maior em folhas e raízes no genótipo tolerante, e envolve alterações dramáticas em muitos aminoácidos. O acúmulo de aminoácidos pode auxiliar na tolerância através do ajustamento osmótico, da detoxificação de espécies reativas de oxigênio e da regulação do pH intracelular. Em quinto lugar, os dados de crescimento e de perfil metabólico permitem sugerir que uma maior indução do crescimento radicular e da respiração no cultivar tolerante, fenômenos propriamente encadeados, e sustentados pelos dados de proteoma (a serem apresentados no capítulo 2). A falta de correlação entre g_s e composição isotópica do ^{13}C com alterações em ABA entre os genótipos, sugere que os maiores teores de ABA estariam associados à proteção contra o estresse oxidativo e, potencialmente, na maior condutividade hidráulica hipotetizada aqui. Em último, mas não de forma menos importante, os experimentos de enxertia recíproca indicam que o sistema radicular do cultivar tolerante é mais importante que a parte aérea na tolerância à seca. A maior redução no crescimento relativo da parte aérea, concomitantemente com uma maior indução do crescimento do sistema radicular sob seca, sem alterar a área foliar, indica que o genótipo tolerante possui um mecanismo diferencial de alocação do carbono para as raízes, sem representar uma redução na fotossíntese, reduzindo, todavia a altura da planta. Este estudo reforça a visão de que a tolerância à seca é uma herança quantitativa, onde vários mecanismos estão envolvidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atkinson HJ, Urwin PE, McPherson MJ. Engineering plants for nematode resistance. *Annual Review Phytopathology* 41: 615 - 639, 2003.
- Bernoux M, Cerri CC, Neil C, Moraes JFL. The use of stable isotopes for estimating soil organic matter turnover rates. *Geoderma* 82: 43 - 58, 1998.
- Bilger W, Schreiber U, Bock M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Ecologia* 102: 425 - 432, 1995.
- Castle, WS, Baldwin JC. Rootstock effects on 'Hamlin' and 'Valencia' orange trees growing at Central Ridge and flatwoods locations. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 118: 4 - 14, 2005.
- Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu JK. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* 45: 437-448, 2005.
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E. A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant Journal* 52: 167 - 174, 2007.
- Cuartero J, Bolarin MC, Asins MJ, Moreno V. Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal Experimental Botany* 57: 1045 - 1058, 2006.
- Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, Levine A, Granot D. Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* 11: 1253 - 1266, 1999.
- Dood IC. Root-to-shoot signalling: assessing the roles of 'up' in the up and down world of long-distance signalling in plant. *Plant and Soil* 274: 251 - 270, 2005.
- Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho JV, Gómez-Cadenas A. Dimultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 8437 - 8442, 2005.
- Eveland AL, Jackson DP. Sugars, signaling, and plant development. *Journal of Experimental Botany* 63: 3367-3377, 2012.
- Fehr WR, Caviness CE. Stages on soybean development. Ames: Iowa State University/Cooperative Extention Service, 11p. (Special Report, 80), 1977.
- Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology* 6: 269-279, 2004.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87 - 92, 1989.

- Gomes-Junior RA, Moldes CA, Delite FS, Pompeu GB, Gratao PL, Mazzafera P, Lea PJ, Azevedo RA. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere* 65: 1330 - 1337, 2006.
- Gonzali S, Novi G, Loreti E, Paolicchi F, Poggi A, Alpi A, Perata P. A turanose-insensitive mutant suggests a role for WOX5 in auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 44: 633 – 645, 2005.
- Goodger JQD, Sharp RE, Marsh EL, Schachtman DP. Relationships between xylem sap constituents and leaf conductance of well-watered and water-stressed maize across three xylem sap sampling techniques. *Journal Experimental Botany* 56: 2389 – 2400, 2005.
- Hirayama T, Shinozaki K. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Science* 12: 343 - 351, 2007.
- Hirayama T, Shinozaki K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant Journal* 61: 1041 – 1052, 2010.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604 – 611, 1999.
- Huck MG, Ishihara K, Peterson CM, Ushijima T. Soybean adaptation to water stress at selected stages of growth. *Plant Physiology* 73: 422 – 427, 1983.
- Iftekhhar A, Shamima AS, Kyung-Hee K, Jae KY, Myung SC, Byung-Hyun L. Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress. *Plant Soil* 333: 491–505, 2010.
- Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 377 - 403, 1996.
- Kranner I, Birtic S. A modulating role of antioxidants in desiccation tolerance. *Integrative and Comparative Biology* 45: 734 – 740, 2005.
- Lange BM. Integrative analysis of metabolic networks: From peaks to flux model. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 220–226, 2006.
- Lima WF, Pípolo AE, Moreira JUV, Carvalho CGP, Prete CEC, Arias CAA, Oliveira MF, Souza GE, Toledo JFF. Interação genótipo-ambiente de soja convencional e transgênica resistente a glifosato, no Estado do Paraná. *Pesquisa agropecuária brasileira* 43 (6): 729-736, 2008.
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* 1: 387 - 396, 2006.
- Liu F, Anderson MN, Jacobson SE, Jensen CR. Stomatal control and water use efficiency of soybean (*Glycine max* L. Merr.) during progressive soil drying. *Environmental Experimental Botany* 54: 33 – 40, 2005.

- Liu FL. Hydraulic and chemical signals in the control of leaf expansion and stomatal conductance in soybean exposed to drought stress. *Functional Plant Biology* 30: 65 – 73, 2003.
- Lockard RG, Schneider GW. Stock and scion growth relationship and the dwarfing mechanism in apple. *Horticulture Review* 2: 315 – 375, 1981.
- Lommen A. MetAlign: Interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data pre-processing. *Analytical Chemistry* 81:3079–3086, 2009.
- Lunn JE, Feil R, Hendriks JHM, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D, Scheible W-R, Carillo P, Hajirezaei M-R, Stitt M. Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry Journal* 397: 139 – 148, 2006.
- Manavalan LP, Guttikonda SK, Tran L-SP, Nguyen HT. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant Cell Physiology* 50: 1260 – 1276, 2009.
- Matiello JB, Santinato R, Garcia AWR, Almeida SRA, Fernandes DR. *Cultura do Café no Brasil, Manual de Recomendações*. Rio de Janeiro e Varginha: Fundação Procafé, 2010. 542p.
- Matthew J P. Trehalose 6-phosphate: a signal of sucrose status. *Biochemistry Journal* 412: e1–e2, 2008.
- McManus MT, Bielecki RL, Caradus JR, Barker DJ. Pinitol accumulation in mature leaves of white clover in response to a water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 43: 11 – 18, 2000.
- Neumann, PM. Evidence for long-distance xylem transport of signal peptide activity from tomato roots. *Journal Experimental Botany* 58: 2217 – 2223, 2007.
- Oxborough K, Baker NR. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components: calculation of qP and $F'v'/F'm$ without measuring F_0' . *Photosynthesis Research* 54: 135 - 142, 1997.
- Praxedes SC, Damatta FM, Loureiro ME, Ferrão MAG, Cordeiro AT. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. kouillou) leaves. *Environmental Experimental Botany* 56: 263 - 273, 2006.
- Read DJ, Bartlett EM. The physiology of drought resistance in soybean plant (*Glycine max*). I. The relationship between drought resistance and growth. *Journal of Applied Ecology* 9: 487 – 489, 1972.
- Sanchez FJ, Manzanares M, de Andres EF, Tenorio JL, Ayerbe L. Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and praline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crops Research* 59: 225 – 235, 1998.

- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemingsen EA. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339 - 345, 1965.
- Silva VP. Caracterização fisiológica da tolerância a seca em *Coffea canephora*: contribuição relativa do sistema radicular e parte aérea. Viçosa, UFV, 2007, 57pp (Tese de doutorado).
- Thompson AJ. Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. *Plant Cell Environmental* 30: 67 – 78, 2007.
- Weckwerth W, Fiehn O. Can we discover novel pathways using metabolomic analysis? *Current Opinion in Biotechnology* 13: 156–160, 2002.
- Wellburn AR. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307 - 313, 1994.
- Williamson JD, Jennings DB, Ehrenshaft M, Guo WW, Pharr DM. Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: Polyols- in multifunctional plant protection. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127: 467 - 473, 2002.
- Zhang J, Ji W, Yang J, Ismail AM. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research* 97: 111–119, 2006.

CAPÍTULO 2

PROTEÔMICA DIFERENCIAL E FOSFOPROTEÔMICA EM RAÍZES DE GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE SOJA SUBMETIDOS DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS

1. INTRODUÇÃO

O sistema radicular apresenta sua importância em prover fontes essenciais de água e nutrientes para a parte aérea das plantas e em muitas circunstâncias reduções do crescimento da parte aérea podem ser explicadas pela inabilidade do sistema radicular em suprir essas fontes necessárias (Norouzi et al., 2008; Dood, 2005). Pesquisas para entendimento da relação existente entre a raiz e a parte aérea, na sinalização e na resposta a estresses, têm aumentado nas últimas décadas (Goodger et al., 2005; Christman et al., 2007; Neumann et al., 2007; Thompson et al., 2007). As plantas são capazes de detectar a deficiência de água no solo independente de alterações no status hídrico da parte aérea mediante transferência de sinais químicos da raiz para parte aérea (Liu et al., 2003), evidenciando a existência de uma comunicação entre ambos os órgãos, e desta forma, facilitando a percepção de sinais a longas distâncias. A sinalização raiz–parte aérea é importante por regular o crescimento através da regulação da expressão gênica de proteínas (Takei et al., 2001), podendo exercer função na alocação ou realocação de carbono entre raiz e parte aérea.

Genes induzidos em condições de estresse têm sua função não somente na produção de importantes proteínas do metabolismo, mas também na regulação de genes envolvidos na transdução de sinais (Dergisi, 2005). Esses genes podem ser separados em proteínas que provavelmente respondem ao estresse, como aquaporinas, proteínas necessárias para produção de vários osmoprotetores (açúcares, prolina, glicina betaina, etc.), proteínas que protegem macromoléculas e membranas, proteínas LEA, chaperonas, proteínas ligadoras de mRNA, proteases e enzimas de detoxificação (Xiong et al., 2002, Bartels & Sunkar, 2005; Saibo et al., 2009). O segundo grupo engloba proteínas envolvidas na regulação da transdução de sinais e expressão gênica (ativação e desativação), como as cinases, fosfatases, fatores de transcrição, fosfolipases C e proteínas de biossíntese de ABA (Dergisi, 2005; Umezawa et al., 2006).

A quantidade de proteínas não se correlaciona sempre com a quantidade de mRNA, especialmente para proteínas de baixa abundância, havendo também diferenças na taxa de tradução. O estudo do proteoma diferencial envolvendo seca tem sua

importância na seleção daquelas proteínas que mais contribuam para o estabelecimento do processo de tolerância, de forma a conduzir estudos mais aprofundados que validem a significância de sua participação nestes mecanismos de tolerância.

Visto a importância do sistema radicular na contribuição para o aumento da tolerância à seca, Iftekhar et al. (2010) analisaram o proteoma diferencial em raízes de soja submetidas a estresse hídrico severo, no estágio V2 (plântulas), encontrando variações significativas em 45 spots de proteínas. Destes, a expressão de cinco proteínas foi *up*-regulada e 21 proteínas foram *down*-reguladas, ao passo que duas proteínas foram detectadas apenas sob condições de seca. As proteínas identificadas neste estudo estão distribuídas em várias classes funcionais, incluindo metabolismo do carbono e nitrogênio, modificação da parede celular, transdução de sinais, defesa celular e morte celular programada. No entanto, esse estudo foi realizado com apenas um genótipo não caracterizado ainda como tolerante, o que não permite considerar que as alterações observadas estejam relacionadas com mecanismos de tolerância a seca em soja.

A exposição das plantas ao estresse hídrico provoca inúmeras mudanças fisiológicas no interior celular, incluindo alterações no metabolismo hormonal e mudanças no proteoma (Salekdeh et al., 2002, Davies, 2010). Cumpre ressaltar que muitas vezes essas mudanças podem ser detectadas pelo proteoma diferencial (Setsuko & Nagib, 2009). Entretanto, algumas mudanças não são perceptíveis mesmo a nível transcricional bem como no proteoma diferencial, embora possam ser perceptíveis a nível fosfoproteômico. Isso se deve ao fato que a fosforilação envolve ativação enzimática e, portanto, pode alterar o fluxo das rotas metabólicas envolvidas (Khan et al., 2005). Uma rota de grande importância na sinalização raiz-parte aérea é a respiração, envolvendo proteínas mitocondriais de células não fotossintetizantes (Havelund et al., 2013). E, até o momento foram relatadas 64 proteínas alvos de fosforilação e 103 fosfossítios em mitocôndrias de plantas (Havelund et al., 2013; Rao e Moller, 2012).

Devido à capacidade regulatória que as modificações pós traducionais (PTMs) exercem sobre a função da enzima, os efeitos da fosforilação sobre a função da enzima e as mudanças no fluxo das rotas envolvidas vêm sendo intensamente investigados (Nakagami et al., 2010). A PTM mais bem estudada é a fosforilação, a qual é catalisada pelas proteínas cinases enquanto a desfosforilação é catalisada pelas proteínas fosfatases. Esta modificação tem como alvo os grupos hidroxilas dos resíduos de serina (Ser), treonina (Thr) e tirosina (Tyr) exercendo um papel chave na sinalização celular. Em mamíferos, tanto a fosforilação como outras PTMs, tais como a acetilação, exercem

funções importantes no metabolismo mitocondrial (Guan & Xiong, 2011; Koc & Koc, 2012), mas, em plantas apenas a fosforilação de proteínas mitocondriais vem sendo estudada em detalhes (Havelund et al., 2013).

O maior grupo de proteínas mitocondriais fosforiladas já relatadas envolve proteínas relacionadas com transporte e energia (Havelund et al., 2013), que foi, também, observada em leveduras (Reinders et al., 2007). Os sítios de fosforilação identificados estão presentes na maioria das enzimas do ciclo de Krebs e dos complexos III e V, ao passo que nenhuma fosfoproteína foi ainda encontrada nos complexos I e II da cadeia de transporte de elétrons (Rasmusson et al., 2008). Provavelmente, a fosforilação oxidativa seja regulada por fosforilação reversível e outros processos importantes que também são regulados pela fosforilação são transcrição, tradução, dobramento de proteínas e transporte metabólico através da membrana mitocondrial interna (Havelund et al., 2013).

Assim sendo, uma forma de melhor compreender os mecanismos de tolerância à seca em soja pode ser aliando os estudos fisiológicos ao estudo do proteoma e fosfoproteoma, a fim de entender a real função das proteínas e fosfoproteínas no processo de tolerância à seca.

Utilizando técnicas de separação de proteínas por eletroforese bidimensional (2D-SDS-PAGE) e de identificação por espectrometria de massas, o presente trabalho objetivou identificar proteínas diferenciais e fosfoproteínas expressas em genótipos contrastantes de soja em resposta à seca.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e imposição do déficit

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no período de abril a junho de 2011, e repetido na mesma época no ano de 2012, com temperatura ambiente de 30 ± 5 °C e umidade relativa de 60 ± 20 %.

As sementes de soja dos cultivares Embrapa 48 (genótipo tolerante ao déficit hídrico) e BR 16 (genótipo sensível ao déficit hídrico), cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA SOJA, Londrina, Paraná), foram germinadas em substrato comercial Plantmax®, onde permaneceram por 10 dias. Em seguida, as plântulas de cada genótipo foram transplantadas, três a três, para vasos de 10 litros contendo solo com adubação natural com esterco bovino curtido (30 % areia, 40 % solo vermelho amarelo, 30 % esterco bovino). Quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento V4 (Fehr & Caviness, 1977) ou período de pré-floração (43 DIAS), foram iniciados os tratamentos.

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

2.2 Análises do proteoma e fosfoproteoma diferencial

As análises do proteoma diferencial foram realizadas nas raízes das plantas de soja nos regimes hídricos: irrigado, déficit moderado ($-1,0$ MPa) e déficit severo ($-1,5$ MPa). Primeiramente, as comparações foram relacionadas às diferenças entre genótipos dentro de cada regime hídrico e numa outra análise compararam-se as proteínas diferencialmente expressas que foram responsivas ao déficit moderado e severo no cultivar tolerante (Embrapa 48). As proteínas em que houve coloração com o corante fluorescente Pro-Q DPS foram selecionadas para análise de expressão diferencial com as comparações relacionadas às diferenças entre genótipos dentro de cada regime hídrico.

2.3 Extração de proteínas

Utilizou-se o método de extração descrito recentemente (Mesquita et al., 2012). As amostras foram trituradas em moinho de bola com nitrogênio líquido. Cerca de 1,5 g do pó obtido foi transferido para tubos Falcon de 50 mL, contendo 0,2 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Foram adicionados 5 mL de solução tampão contendo

Tris-HCl 40 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Sacarose 250 mM, Triton X-100 1% (v/v), β mercaptoetanol 2% (v/v), 50 μ L de inibidor de protease Sigma P9599 e 50 μ L de inibidor de fosfatase Sigma P9455. Para uma melhor homogeneização utilizou-se o *Polytron homogenizer* (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY, EUA). As amostras foram vortexadas e mantidas sob agitação constante por 2 h a 4 °C.

Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 6.000 x *g* por 20 min, a 4 °C e o sobrenadante foi coletado. Foram adicionados mais 5 mL de tampão de extração e os tubos foram mantidos sob agitação por uma hora a 4 °C. Procedeu-se a uma nova centrifugação, seguida da coleta do sobrenadante que foi combinado com o anterior. Adicionou-se ao sobrenadante, contendo as proteínas solúveis, 10 mL da solução de TCA 10% (p/v) em acetona gelada, mantendo o mesmo *overnight* a -80 °C para precipitação das proteínas. No dia seguinte as amostras foram centrifugadas e o *pellet* foi lavado duas ou três vezes com 5 mL de acetona 80% (v/v) (até clarificar), e duas vezes com 5 mL de etanol 80% (v/v). Durante as lavagens foram feitas agitações em Vortex com posterior centrifugação a 6.000 x *g* por 10 min.

O *pellet* final foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e deixado secar a temperatura ambiente. As proteínas foram solubilizadas em tampão de solubilização contendo ureia 7 M, tiourea 2 M e CHAPS 4 % e depois sonicadas em banho de gelo numa potência 10 %, em sonificador marca *UltraSonic Processor* (Modelo GE 50). As proteínas extraídas foram armazenadas em *freezer* -20 °C.

2.4 Quantificação das proteínas

A concentração proteica foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) e utilizou-se albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão.

2.5 Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

2.5.1 Focalização isoeletrica (IEF)

Foram utilizadas tiras de 24 cm com intervalo linear de pH 3,0 a 10,0 para a realização da focalização isoeletrica (IEF). Inicialmente, as tiras foram reidratadas durante um período de 14 h a 16 h em aparato de reidratação IPGBOX (GE Healthcare). Foram aplicados 450 μ L de solução contendo 1000 μ g de proteínas, tampão IPG 2% e solução *Destreak* (GE Healthcare).

A IEF foi realizada no equipamento IPGphor III (GE Healthcare) sob temperatura controlada de 20°C de acordo com as seguintes etapas: 1) 200 Vxh em passo único por 2 horas; 2) 500 Vxh em passo único de 500 volts; 3) 800 Vxh em gradiente até 1000

volts; 4) 16.500 Vxh em gradiente até 10.000 volts; 5) 22.000 Vxh em passo único de 10.000 volts. A amperagem máxima foi de 75µA/tira.

2.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para a análise da segunda dimensão, as tiras foram previamente equilibradas após a IEF em 5 mL de solução de equilíbrio (Tris-HCl 75 mM pH 8,8, ureia 6 M, glicerol 30 %, SDS 2 % e azul de bromofenol 0,002 %) sob agitação por 20 min. Foram realizadas duas etapas de equilíbrio com a finalidade de reduzir e alquilar as proteínas. À primeira etapa, foi adicionado 1 % de DTT ao tampão de equilíbrio e, na segunda etapa, adicionou-se 2,5 % de iodoacetamida.

A segunda dimensão da eletroforese foi efetuada em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), utilizando a metodologia descrita por Laemmli (1970), em gel de separação na concentração de 12,5% de poliacrilamida, em cuba tipo DaltSix (GE Healthcare). As tiras previamente equilibradas foram colocadas no topo do gel de poliacrilamida na presença de SDS e seladas com solução de agarose 0,5 %. Como marcadores de massa molecular foram utilizadas as proteínas: fosforilase *b* (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

A corrida foi realizada em uma etapa inicial de 20 mA/gel por 30 min e, em seguida, a 40 mA/gel até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel. A temperatura foi mantida a 10 °C por meio de refrigeração com circulador termostático.

Terminada a corrida, os géis 2-D foram colocados em solução de fixação contendo ácido acético a 10 % (v/v) e metanol a 50 % (v/v) *overnight*. Após a etapa de fixação os géis foram primeiramente corados na ausência de luz com o corante fluorescente específico para fosfoproteínas Pro-Q Diamond (Pro-Q DPS) (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguindo todos os passos sugeridos por Agrawal & Thelen (2009). Logo após a captura das imagens dos géis por fluorescência, os géis foram corados por 48 h com solução contendo sulfato de amônio 8 % (m/v), ácido fosfórico 0,8 % (v/v), *Coomassie blue* G-250 0,08 % (v/v) e metanol 20 % (v/v) (Neuhoff et al., 1985). Após essa etapa, os géis foram lavados com solução de ácido acético 1 % (v/v) até a eliminação completa do corante excedente.

2.5.3 Captura das imagens e análise da expressão

As imagens dos géis corados com o corante Pro-Q DPS foram digitalizadas usando o equipamento FLA 5000 *laser scanner* (Fuji Medical Systems, Stamford, CT) no modo de escaneamento fluorescente, resolução de 300 dpi, filtro de excitação de 532 nm e emissão

de 580 nm. As imagens foram calibradas com o *software Multi Gauge* (Fuji Medical Systems, Stamford, CT). As análises comparativas das imagens digitais foram efetuadas utilizando o *software Image Master 2D Platinum* (GE-Healthcare).

As imagens dos géis corados com Comassie G-250 (*Colloidal*) foram digitalizadas usando o *Image Scanner III* (GE Healthcare) no modo de escaneamento transparente, resolução de 300 dpi, filtro de cor vermelho e com fórmula de calibração atualizada. As imagens foram calibradas com o *software Labscan* (GE Healthcare). As análises comparativas das imagens digitais foram efetuadas utilizando o *software Image Master 2D Platinum* (GE-Healthcare).

Através desse *software* foi feita a detecção automática dos pontos proteicos seguidas de correções manuais quando necessário. As correções foram realizadas com a finalidade de eliminar *spots* falso positivos, inserir *spots* falso negativos, efetuar correções quanto a delimitação das regiões dos *spots* e correção de *matches*.

Foi estimado os pontos isoelétricos e massas moleculares, assim como seus níveis de expressão. Este último parâmetro foi mensurado pelo programa através da avaliação do volume (densidade ótica e área) dos *spots* contidos no gel.

A comparação foi feita entre géis de plantas sob diferentes regimes hídricos de genótipos contrastantes para seca e também foi feita comparação entre plantas irrigadas e sob déficit hídrico no cultivar tolerante, considerando três repetições biológicas para cada tratamento. Foram considerados diferencialmente expressos, *spots* que apresentaram uma variação de sobreposição de medidas acima de 1,5 e ANOVA ($p < 0,05$).

Para os *spots* diferencialmente expressos foi calculada uma porcentagem de seu volume e a comparação desses valores indicou a diferença de expressão entre os tratamentos.

Para análise do fosfoproteoma, a comparação foi feita entre géis de plantas sob diferentes regimes hídricos de genótipos contrastantes para seca considerando três géis para cada tratamento, feitos de extratos normalizados de três plantas diferentes (repetições biológicas). As imagens dos géis corados com o corante fluorescente Pro-Q DPS foram sobrepostos aos géis corados com Colloidal Comassie e localizados os *spots* marcados como fosfoproteínas para posterior retirada dos géis para identificação. Nas imagens fluorescentes, os *spots* marcados como fosfoproteínas foram avaliados pela porcentagem de seu volume e a comparação desses valores indicou o tipo de regulação: positiva (+), quando aumentava a abundância relativa no cultivar tolerante em relação ao sensível; negativa (-), quando diminuía a abundância relativa e igual ou invariável

(=), quando a diferença de expressão não foi significativa pela ANOVA a 5% de probabilidade.

2.5.4 Tripsinização da amostra proteica

A tripsinização foi realizada segundo metodologia sugerida por Shevchenko et al. (2006), com algumas modificações. Os *spots* correspondentes a proteínas diferencialmente expressas e proteínas fosforiladas foram retirados dos géis com auxílio de uma ponteira esterilizada de 1000 μ L, com a ponta cortada. Para remoção dos corantes, os pedaços de gel contendo as proteínas foram lavados duas vezes com solução de acetonitrila 50 % / bicarbonato de amônio 25 mM e outra lavagem com solução de metanol 50 % / bicarbonato de amônio 25 mM, sendo que a primeira lavagem foi *overnight* e as demais por 1 h no dia seguinte. As lavagens foram realizadas à temperatura ambiente a 750 rpm no aparelho *Thermomixer digital Comfort* (Eppendorf).

A seguir, a solução de descoloração foi removida e os pedaços de gel foram desidratados com acetonitrila por 5 min duas vezes e secos em *Speed Vac Concentrator Plus* (Eppendorf) por 15 min. As proteínas foram, então, reduzidas com DTT a 25 mM em bicarbonato de amônio a 100 mM por 30 min a 56 °C, em *Thermomixer*, a 500 rpm. Após esta etapa, as proteínas foram alquiladas com iodoacetamida a 75 mM em bicarbonato de amônio a 100 mM por 30 min, à temperatura ambiente, na ausência de luz, e incubadas em *Thermomixer* a 500 rpm. Sequencialmente, os pedaços de gel foram, por duas vezes, lavados em bicarbonato de amônio a 100 mM por 10 min, desidratados em acetonitrila por 5 min e após uma etapa adicional de desidratação, secos em *Speed Vac* por 15 min.

Para a etapa de digestão enzimática os géis foram reidratados com solução contendo tripsina (20 ng/ μ L) em solução de bicarbonato de amônio 40 mM / acetonitrila 10%. A tripsina utilizada foi a *Trypsin Gold, Mass Spectrometry grade, Promega* V5280. Foram aplicados 15 μ L de solução de clivagem de forma a cobrir os pedaços de gel e as amostras permaneceram em banho de gelo durante 45 min para que a enzima pudesse penetrar no gel sem que se iniciasse a digestão. Após este período, 50 μ L da solução de bicarbonato de amônio 40 mM/acetonitrila 10% foram adicionados a cada amostra. As amostras foram, então, incubadas a 37 °C por 16 h sob agitação a 500 rpm.

Após a digestão, os pedaços de gel foram submetidos a banho ultrassom por 10 min, agitados a 1.500 rpm por 2 min e toda a solução do tubo foi removida para um novo tubo. Com a finalidade de recuperar o maior número de fragmentos trípticos, a cada pedaço de gel restante foram adicionados 40 μ L da solução de ácido fórmico 5 % /

acetonitrila 50 % e 40 µL da solução de ácido fórmico 5 % / metanol 60 %, em duas etapas sequenciais. As amostras foram submetidas a agitação a 1.500 rpm por 2 min, incubados por 15 min em repouso a temperatura ambiente, 10 min no banho ultrassom e novamente submetidas a agitação a 1.500 rpm por 2 min. Em cada passo toda a solução foi removida e juntada à solução do tubo novo.

Os *spots* corados por *Colloidal Comassie* tiveram a solução contendo os peptídeos trípticos evaporada em *Speed Vac* até um volume final de 5 µL e acrescidos de 5 µL de solução contendo acetonitrila 50 % / TFA 0,1 %. As amostras que apresentaram uma grande quantidade de sal foram dessalinizadas em coluna de hidrofobicidade C18 (*Zip Tip*) da marca *Eppendorf* seguindo as recomendações do fabricante.

Já no caso dos *spots* oriundos dos géis corados com o corante fluorescente, após as etapas de tripsinização, a solução foi totalmente evaporada em *Speed Vac* e os tubos contendo os peptídeos trípticos foram ressuspensos em 40 µL de solução contendo ácido fórmico a 0,1 %.

2.5.5 Espectrometria de massa

A identificação de proteínas diferencialmente expressas coradas por coomassie coloidal foi realizada utilizando um espectrômetro de massa do tipo AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (*Applied Biosystem*) disponibilizado pelo Núcleo de Proteoma do Laboratório de Toxinologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ).

Alíquotas de 0,3 µL de cada amostra contendo os peptídeos trípticos foram aplicadas sobre uma placa de aço, juntamente com a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxil-cinâmico (Sigma), numa proporção 1:1. Após a cristalização a placa foi inserida no espectrômetro e a análise iniciada. A ionização dos peptídeos foi feita utilizando a técnica de MALDI e o método de detecção do tipo TOF/TOF. O equipamento foi operado no modo positivo e com o refletor ativado. Após a obtenção das massas dos fragmentos trípticos, os quinze peptídeos mais intensos foram automaticamente selecionados e submetidos à análise por MS/MS. A fragmentação foi realizada pelo método do decaimento pós-fonte (*post-source decay*).

A identificação de proteínas fosforiladas, coradas com Pro-Q DPS, foi realizada em um espectrômetro de massa do tipo Ion Trap com sistema nanoAcquity ultra performance LC (Waters) acoplado ao espectrômetro Amazon ETD (Bruker) disponibilizado pelo Laboratório de Biologia Molecular de Plantas localizado no Bioagro da Universidade Federal de Viçosa.

2.5.6 Identificação de proteínas por espectrometria de massa

A identificação das proteínas foi realizada por meio dos dados de MS/MS *ion search* confrontando-os com sequências obtidas das proteínas presentes nos bancos de dados com auxílio do *software* Mascot versão 2.2.07 (Matrix Science, 2012). As pesquisas foram realizadas nos bancos de dados públicos do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e *Phytozome*. Nesse último banco se encontram as sequências obtidas pelo sequenciamento do genoma da soja (*Glycine max*) (Phytozome, 2012).

Os parâmetros utilizados para a busca das proteínas foram: peptídeos com até dois sítios de clivagem perdidos; erro de 0,1 Da para identificação de peptídeos; como modificações variáveis escolheu-se carbamidometilação dos resíduos de cisteína, oxidação dos resíduos de metionina, e deaminação dos resíduos de asparagina e glutamina. No caso das proteínas marcadas como fosforiladas pelo Pro-Q DPS foram adicionadas as modificações por fosforilação.

Após a identificação das proteínas foi realizada a validação das mesmas pelo *software* Scaffold (Proteome Software).

Para as fosfoproteínas validadas foi realizada uma busca na plataforma *Plant Protein Phosphorylation Data Base* (P³DB) (Yao et al., 2012; Gao et al., 2009) com o intuito de verificar se a proteína já foi identificada como alvo de fosforilação.

3. RESULTADOS

3.1 Análise do proteoma diferencial de raízes de soja em cultivares contrastantes ao déficit hídrico

A análise do proteoma diferencial foi realizada em raízes de soja do mesmo material caracterizado fisiologicamente no capítulo 1.

Para os *spots* onde foi verificada correspondência (alteração na expressão da proteína) nos três géis (repetições biológicas) procedeu-se a análise de expressão diferencial através da diferença entre a abundância relativa de cada *spot* nos diferentes cultivar dentro de um mesmo tratamento. A análise foi determinada através da média da abundância relativa de três repetições biológicas. Os *spots* onde a abundância relativa aumentou ou diminuiu em pelo menos 1,5 vezes e foi significativa pela ANOVA ($p < 0,05$), foram classificados como diferencialmente expressos e retirados do gel para identificação por espectrometria de massa (MS). Dentre os *spots* retirados para a identificação, todos apresentaram reprodutibilidade entre as três réplicas dentro de cada cultivar, e intensidade suficiente para identificação dos picos de peptídeos por MS.

Pela análise das imagens dos géis bidimensionais de raízes de soja foi detectado um total de 87 *spots* diferencialmente expressos em comparação com os genótipos tolerante (Embrapa 48) e sensível (BR16) nos diferentes regimes hídricos (irrigado, déficit moderado e déficit severo). Destes, 82 puderam ser identificados por MS/MS. No tratamento irrigado foram encontrados 33 *spots* diferencialmente expressos, sendo que 32 foram identificados. Foram detectados 13 *spots* diferencialmente expressos no tratamento de déficit moderado, sendo que 10 foram identificados. Já sob déficit severo, 41 *spots* foram diferencialmente expressos e 40 foram identificados (Tabelas 1, 2 e 3, material suplementar).

A identificação das proteínas foi realizada pelo auxílio do *software* Mascot, que apresentou valores de escores significativamente acima do limite mínimo de confiabilidade e foram confirmadas pelo *software* Scaffold, com pelo menos 98% de probabilidade indicando alta confiabilidade na identificação das proteínas.

3.1.1 Proteínas diferencialmente expressas na condição irrigada nos genótipos contrastantes

Nas raízes do cultivar tolerante Embrapa 48, em comparação com o cultivar sensível BR 16, na ausência de estresse, apresentaram um total de 33 *spots* diferencialmente expressos, dos quais um aumento na abundância relativa em 19 *spots* e redução em 14 *spots* foi observada. Os 32 *spots* que foram identificados no tratamento

irrigado corresponderam a 22 proteínas diferentes, pois foram encontradas algumas possíveis isoformas ou modificações de uma mesma proteína, representada por mais de um *spot* em um mesmo gel. Da maneira geral, houve aumento na expressão nas proteínas do cultivar tolerante e essas estão envolvidas em diferentes processos importantes como respiração, englobando ciclo oxidativo das pentoses fosfatadas e glicólise (*spots* 330, 202), metabolismo antioxidativo (*spots* 0, 1, 3, 5, 358 e 400), metabolismo do nitrogênio (*spots* 212 e 213), metabolismo secundário (*spots* 161, 59, 144, 220 e 359), defesa (*spots* 24), regulação (*spot* 33) e reserva (*spots* 90 e 91). Houve redução na abundância relativa em 14 *spots* no cultivar tolerante em comparação com o sensível, estando estas proteínas envolvidas nos processos de fixação de N₂ (*spots* 388 e 389), metabolismo antioxidativo (*spots* 326 e 324), respiração (*spot* 197, 282, 419 e 393) e regulação (*spots* 264, 214 e 216) (Figura 1).

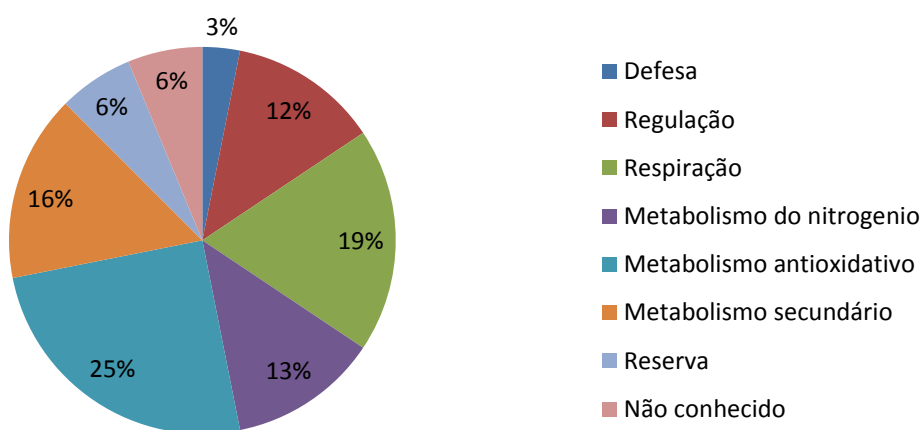


Figura 1. Classificação funcional de proteínas de raízes de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao cultivar sensível (BR 16) sob condições irrigadas (controle). Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas UniProt (Universal Protein Resource).

A expressão relativa das proteínas diferencialmente expressas de acordo com a função ou metabolismo envolvido pode ser observada na figura 2. A abundância relativa foi normalizada pelo cultivar sensível, tendo valor unitário para este cultivar.

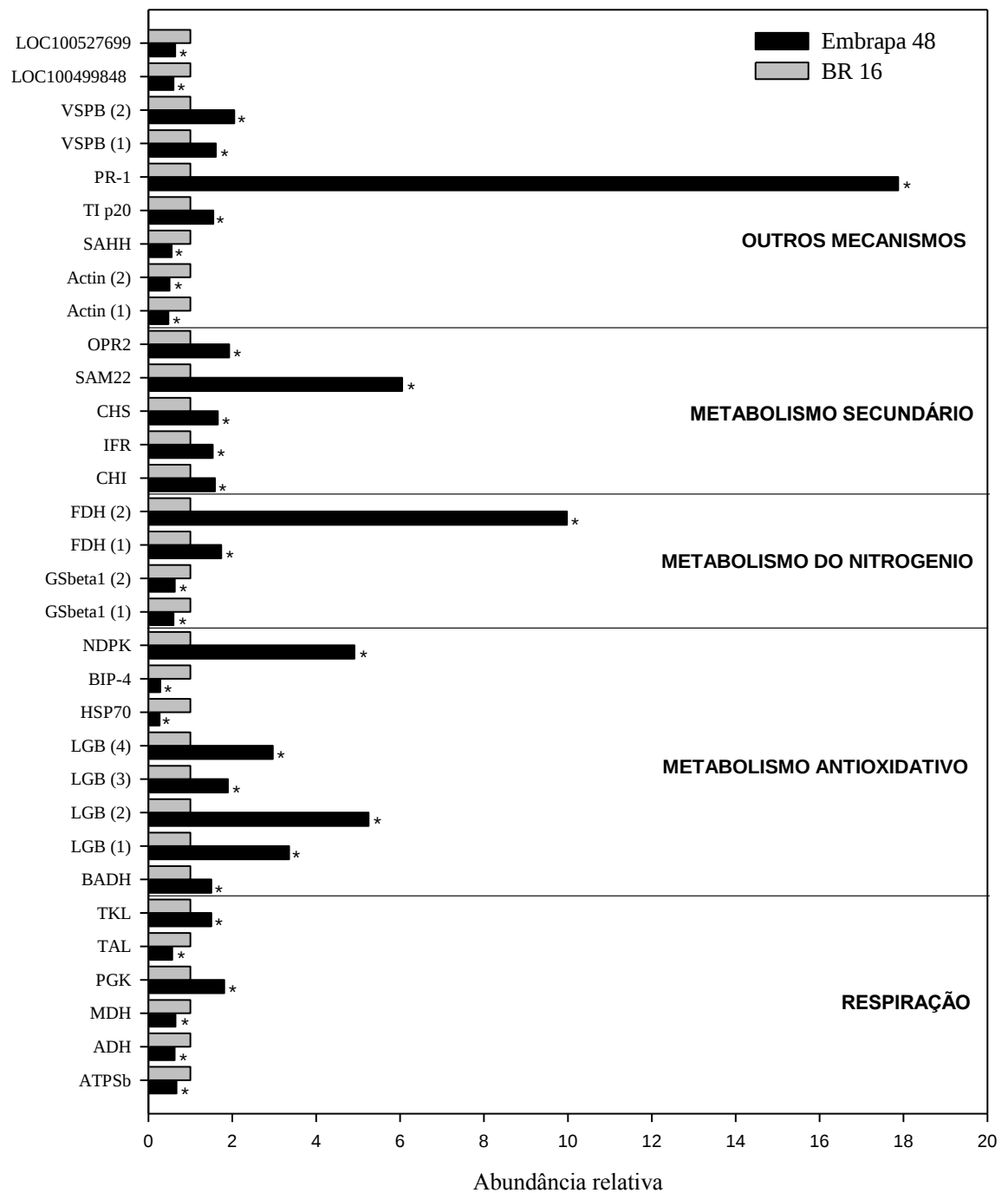


Figura 2. Expressão relativa de proteínas diferencialmente expressas na condição irrigada (controle). Abundância relativa normalizada pela cultivar sensível (BR16). ATP sintase mitocondrial (ATPSb), Álcool desidrogenase (ADH), Malato desidrogenase (MDH), Fosfoglicerato cinase (PGK), Transaldolase (TAL), Transcetolase (TKL), peroxisomal betaine-aldehyde dehydrogenase (BADH), Leghemoglobina (LGB), Hsp 70 kDa (HSP70), Luminal-binding protein 4-like (BIP-4), Nucleosídeo difosfato cinase (NDPK), Glutamina sintetase (GSbeta1), Formato desidrogenase (FDH), Chalcona isomerase (CHI), Isoflavona redutase (IFR), NAD(P)H-dependent 6'-deoxychalcone synthase (CHS), S-adenosilmetionina sintase (SAM22), 12-oxophytodienoate reductase 2-like (OPR2), Actina (Actin), S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, partial (SAHH), Trypsin inhibitor p20 precursor (TI p20), Proteína relacionada a patogênese (PR-1), Precursor da glicoproteína de reserva de 31 kDa (VSPB). * indica aumento ou redução na % volume ($P < 0,05$).

Um dos principais grupos de proteínas que difere entre os genótipos está relacionado à respiração. No primeiro capítulo também foi possível observar grandes mudanças no perfil metabólico de intermediários glicolíticos e do Ciclo de Krebs. Novamente, na ausência de estresse, podemos ver diferença nos níveis proteicos de enzimas destas rotas metabólicas. A fosfoglicerato cinase (PGK), foi mais abundante no cultivar tolerante em relação ao sensível. Essa enzima atua na via glicolítica na conversão do 1,3-bisfosfoglicerato em 3-fosfoglicerato, que resulta na produção de uma molécula de ATP. A enzima transcetolase (TKL) apresentou-se mais abundante nas raízes de plantas irrigadas no cultivar tolerante. Essa enzima participa da fase não oxidativa da via das pentoses fosfatadas promovendo a transferência reversível de um grupo cetol de 2 carbonos da xilulose-5-P a um receptor aldose. Essa enzima é, portanto, importante no ciclo das pentoses, e potencialmente na fase de regeneração do ciclo de Calvin-Benson. A enzima nucleosídeo difosfato cinase (NDPK) foi fortemente expressa no cultivar tolerante em relação ao sensível na condição irrigada. NDPK, uma enzima ubíqua em eucariontes e procariontes, catalisa a transferência de fosfato a partir de γ ATP para NDP por autofosforilação (Parks & Agarwal, 1973). Cumpre mencionar portanto, que NDPK é uma enzima importante para a manutenção de níveis estáveis de GTP por homeostase de nucleotídeos em várias rotas metabólicas, tais como a síntese de proteínas e de DNA e vias de transdução de sinais mediado por GTP.

Outro grupo de proteínas que são diferencialmente expressas entre os genótipos na ausência do estresse envolvem enzimas do metabolismo secundário. A S-adenosilmetionina sintase (SAM22), importante enzima na síntese do etileno e das putrescinas, foi mais abundante no cultivar tolerante na condição irrigada em relação ao cultivar sensível. A isoflavona redutase (IFR) apresentou-se mais expressa no genótipo tolerante na condição irrigada em relação ao genótipo sensível. Essa enzima, específica da via de biossíntese dos isoflavonoides (Zabala et al., 2006), é encontrada tipicamente em leguminosas. Ela catalisa uma redução dependente de NADPH, envolvida na biossíntese de compostos derivados da via dos fenilpropanoides. Verificou-se também que a proteína *12-oxophytodienoate reductase 2-like* (OPR2) teve maior abundância na condição irrigada nas plantas tolerantes. Essa proteína participa da biossíntese do ácido jasmônico, do metabolismo de lipídeos e biossíntese de oxilipina. Outras proteínas do metabolismo secundário que também sofreram aumentos na abundância foram chalcona isomerase (CHI) e *NAD(P)H-dependent 6'-deoxychalcone synthase* (CHS), enzimas essas relacionadas com a biossíntese de fenilpropanoides e flavonoides, respectivamente.

O grupo de proteínas que apresenta função de reserva e mostra aumento no cultivar tolerante na condição irrigada é representado por duas isoformas da proteína precursora da glicoproteína de reserva (VSPB). Essa proteína também é conhecida como proteína de reserva vegetativa (*vegetative storage protein* - VSPB). Durante a formação da semente estas proteínas são degradadas para suprir a semente com o nitrogênio necessário ao seu desenvolvimento (Wittenbach, 1983; Staswick, 1994). Em geral, elas são sujeitas a regulação por açúcares, luz, fosfato, nitrogênio, ferimento, auxinas e jasmonatos (Mason & Mullet, 1990; Mason et al., 1992; Berger et al., 1995). Essa mesma proteína foi diferencialmente expressa em soja submetida a estresse por alagamento (Komatsu et al., 2010).

Proteínas com maior abundância no tolerante e relacionadas com o metabolismo antioxidativo incluem a *peroxisomal betaine-aldehyde dehydrogenase* (BADH), uma importante enzima para síntese de glicina-betaína, um osmólito não tóxico envolvido em mecanismos de adaptação a estresses abióticos. Também foi representada pela leghemoglobina (LGB), por meio de quatro *spots* diferentes. Essa proteína fornece oxigênio para os bacteroides, essencial para a fixação simbiótica de nitrogênio. Algumas isoformas de leghemoglobina não transportam oxigênio, mas reagem com radicais livres e tem uma ação antioxidativa (Günther et al., 2007). Esse aumento no cultivar tolerante indica uma maior capacidade de nodulação nesse genótipo, tendo maior suprimento de nitrogênio, e indica também uma maior capacidade antioxidativa do que o genótipo sensível, mesmo na ausência do estresse. Estas duas contribuições podem estar associadas com a menor redução do crescimento radicular no tolerante em presença do estresse hídrico.

O grupo das proteínas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos, que tiveram maior abundância no tolerante, foi representado por duas isoformas da formato desidrogenase (FDH). Esta enzima é importante para a síntese da serina a partir da glicina, que ocorre na mitocôndria (Alekseeva et al., 2011).

A proteína relacionada a patogênese (PR1) também foi altamente expressa no cultivar tolerante na condição irrigada em comparação com o cultivar sensível e exerce função de defesa. As proteínas relacionadas com infecção por patógenos, proteínas PR, são codificadas por genes do tipo *Ypr*, atuando na defesa a invasão por patógenos causando a indução da transcrição de proteínas responsivas a patógenos (Bishop et al., 2000). São divididas em várias classes e famílias gênicas que desempenham várias funções específicas (Van-Lon et al., 2006). No caso específico da PR1 ela é uma quitinase (Alegado et al., 2011).

Quatro proteínas relacionadas a respiração apresentaram menor abundância relativa no cultivar tolerante. Uma delas foi a subunidade beta da enzima ATP sintase mitocondrial (ATPSb). A ATPSb é um complexo enzimático envolvido diretamente na produção de ATP pelo uso de ADP e fosfato inorgânico através da utilização do gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, realizando a fosforilação oxidativa (Boyer, 1997; Stock et al., 1999). A proteína malato desidrogenase mitocondrial (MDH) também foi menos abundante no cultivar tolerante na condição irrigada. Esta enzima está envolvida no metabolismo do malato, o qual pode ser uma importante válvula metabólica para renovar o NAD mitocondrial necessário para as reações do ciclo de Krebs, evitando excesso de poder redutor nesta organela, o qual poderia resultar em maior dano oxidativo (Bischof et al., 2003). A enzima transaldolase (TAL), promove uma ligação entre a via glicolítica e das pentoses fosfatadas. Foi evidenciado também menor expressão da proteína álcool desidrogenase (ADH) na condição irrigada nas plantas tolerantes em comparação com as sensíveis. A álcool desidrogenase é uma enzima relacionada a respiração anaeróbica e fermentação nas plantas.

O grupo de proteínas antioxidativas que foi observada menor abundância no cultivar tolerante foi representada pelas proteínas Hsp 70 kDa (HSP70) e *Luminal-binding protein 4-like* (BIP-4) e estão envolvidas nos processos de empacotamento das proteínas na conformação correta, atividade muito importante durante o estresse oxidativo, que leva a desnaturação das proteínas (Denecke et al., 1991).

Outro grupo de enzimas do metabolismo primário expressas diferencialmente está relacionado a biossíntese de aminoácidos, onde foi observado menores níveis de duas proteínas glutamina sintetase (GSbeta). Nos géis 2D analisados a GSbeta1 e 2 tiveram menor abundância nas raízes em plantas irrigadas do cultivar tolerante. Apesar de o tolerante ter menor abundância que o sensível, na presença de déficit hídrico (como mostrado mais adiante, e no capítulo 1), observa-se maior expressão e isto é paralelo a maiores teores de glutamina e de outros aminoácidos sintetizados a partir deste aminoácido. Duas outras proteínas, com função não caracterizada, foram identificadas como sendo menos expressas nas raízes de plantas tolerantes.

Na figura 3 estão representados os *spots* que apresentaram abundância diferencial em raízes do tratamento irrigado (controle) e que foram retirados para análise e detecção por MS/MS. O número de identificação de cada um dos *spots* indicado no gel bidimensional permite a verificação da abundância relativa de cada *spot* na tabela 1 (material suplementar) que estão identificados pelo Spot ID.

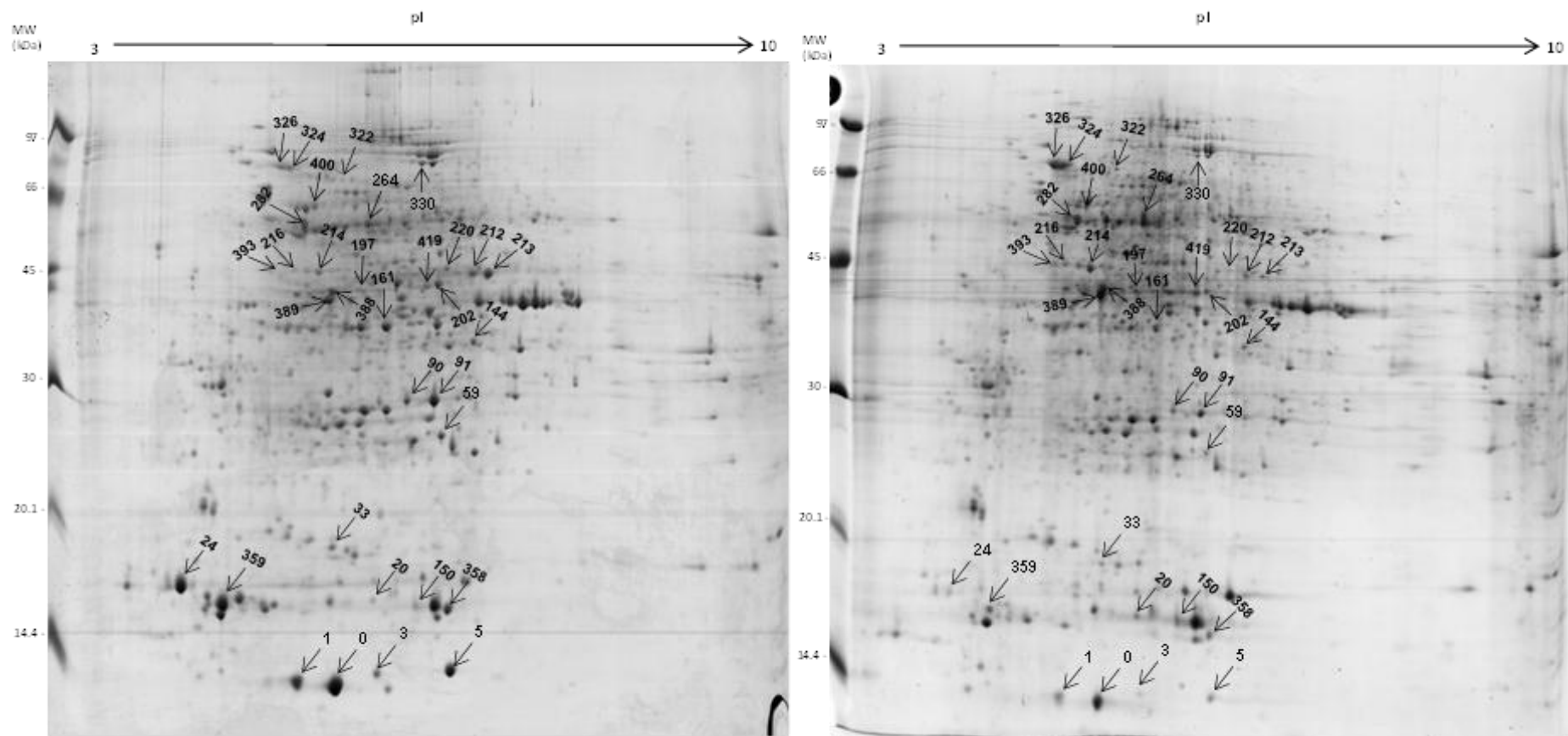


Figura 3. Proteínas de raízes de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao cultivar sensível (BR 16) sob condições irrigadas (controle). As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 3-10, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com *Coomassie* coloidal. A expressão diferencial foi analisada no *software ImageMaster 2D Platinum*.

3.1.2 Proteínas diferencialmente expressas na presença de déficit moderado nos genótipos contrastantes

Na condição de déficit moderado foi verificada menor diferença no proteoma entre os genótipos tolerante e sensível, apresentando apenas 13 proteínas diferencialmente expressas, sendo delas 10 identificadas (Tabela 2, material suplementar).

Dos 10 *spots* diferencialmente expressos identificados ocorreu aumento da abundância em seis proteínas estando elas envolvidas nos seguintes processos: metabolismo antioxidativo (*spot* 30), respiração (*spots* 28 e 38), metabolismo secundário (*spot* 55 e 101), fixação de Nitrogênio (*spot* 76) e houve redução em sete proteínas envolvidas no metabolismo antioxidativo (*spot* 53), sinalização (*spot* 61), metabolismo secundário (*spot* 110) e outra com função ainda não conhecida em plantas (*spots* 152) (Figura 4).

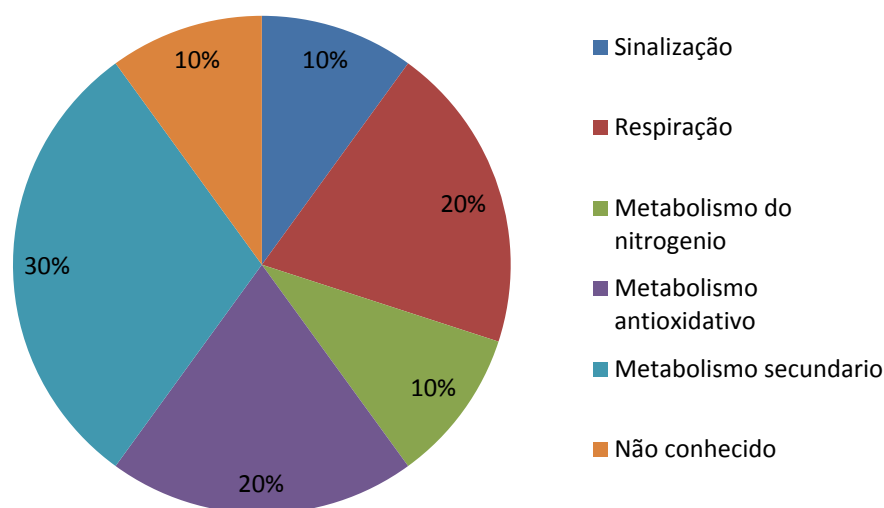


Figura 4. Classificação funcional de proteínas de raízes de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao cultivar sensível (BR 16) sob condições de déficit moderado (-1,0 MPa). Classificação baseada no catálogo de informações de proteínas UniProt (Universal Protein Resource).

Na figura 5 é possível verificar a expressão relativa das proteínas diferencialmente expressas de acordo com a função ou metabolismo envolvido. A abundância relativa foi normalizada pelo cultivar sensível na presença de déficit moderado.

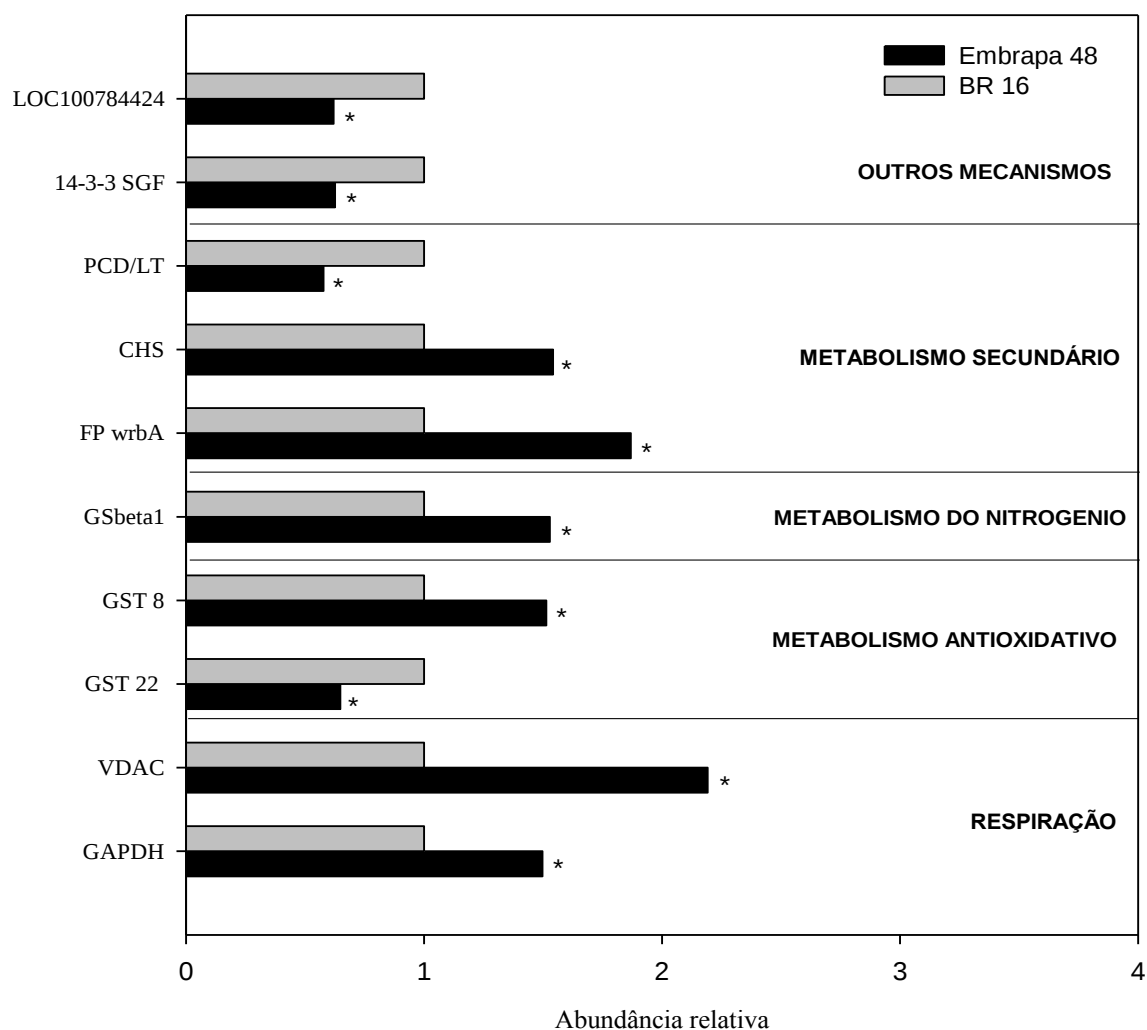


Figura 5. Expressão relativa de proteínas diferencialmente expressas na presença de déficit moderado (-1,0 MPa). Abundância relativa normalizada pela cultivar sensível (BR16). Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Peroxisomal voltage-dependent anion-selective channel protein (VDAC), Glutathione S-transferase (GST), Glutamina sintetase (GSbeta1), Flavoproteína wrbA (FP wrbA), NAD(P)H-dependent 6'-deoxychalcone synthase (CHS), Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein (PCD/LT), Proteína adaptadora 14-3-3. * indica aumento ou redução na % volume ($P < 0,05$).

Os principais grupos de proteínas que diferem entre os genótipos sob déficit moderado estão relacionados ao metabolismo primário, secundário e antioxidativo (Figura 4 e 5; Tabela 2, material suplementar). Com relação ao metabolismo primário a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) teve sua abundancia relativa aumentada no cultivar tolerante. A GAPDH é uma enzima chave na glicólise que catalisa a conversão de D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em 3-fosfo-D-gliceroil fosfato, sendo essencial para a manutenção dos níveis de ATP celular e metabolismo de carboidratos. A menor expressão da GAPDH em raízes do cultivar sensível e a capacidade do cultivar tolerante manter ou aumentar o conteúdo de GAPDH na glicólise

pode ser um componente importante que contribui para a tolerância à seca, promovendo simultaneamente a produção de energia e a defesa antioxidante (Rivero et al., 2009). Ao contrário do observado na ausência de estresse, a glutamina sintetase (GSbeta1) apresentou aumento na sua abundância relativa no cultivar tolerante sob déficit moderado. A GSbeta1 é uma enzima crucial em plantas superiores envolvidas na assimilação de nitrogênio inorgânico (amônia) em forma orgânica (glutamina), e na síntese de outros aminoácidos fornecendo amônia para transaminases. Existem diferentes isoformas expressas em órgãos e em estágios de desenvolvimento específicos (Cren & Hirel, 1999; Ireland & Lea, 1999). Outra proteína relacionada a respiração que teve aumento no tolerante é a *Peroxisomal voltage-dependent anion-selective channel protein* (VDAC). Essa é uma proteína de membrana com provável função de porina na membrana mitocondrial (Dihanich et al., 1987; Lee et al., 1998)

O grupo relacionado ao metabolismo secundário que apresentou aumento na abundância no cultivar tolerante foi representado por duas proteínas, uma flavoproteína wrbA (FP wrbA) e uma *NAD(P)H-dependent 6'-deoxychalcone synthase-like* (CHS). Flavoproteína wrbA é uma oxidoredutase que transfere elétrons entre NADPH e a flavina mononucleotideo (FMN). Essa classe de proteínas forma uma nova família multimérica de proteínas semelhantes à flavodoxinas, que estão amplamente distribuídas em organismos vivos como bactérias, fungos e em plantas superiores (Grandori & Carey, 1994; Patridge & Ferry, 2006). Apresenta resposta a estresse osmótico e por metais pesados, além de responder a estímulos pelo hormônio auxina. Liu et al. (2012) identificaram que essa proteína é mais expressa em gramíneas sob estresse salino.

Com relação ao grupo relacionado ao metabolismo antioxidativo, verifica-se aumento no cultivar tolerante apenas na enzima glutathione S-transferase (GST). As glutathione transferases (GSTs) compreendem uma família de enzimas multifuncionais e são consideradas as principais enzimas detoxificantes com a capacidade de catalisar a conjugação de moléculas eletrofílicas para o tripeptídeo glutathione (GSH; γ -glutamyl-cisteina-glicina) (Dixon et al., 2002), o que pode levar ao seu transporte para dentro do vacúolo e sua degradação, evitando danos oxidativos. Em plantas foram confirmadas e nomeadas seis classes de GST: Phi, Tau, Theta, Zeta, Lambda e DHAR (Dixon et al., 2002). A expressão das diversas classes de GSTs de vegetais é altamente variável de acordo com o tecido e condições ambientais (Soranzo et al., 2004).

As proteínas que foram menos abundantes no cultivar tolerante incluem alguns membros dos grupos do metabolismo antioxidativo, metabolismo secundário e

sinalização. No grupo do metabolismo antioxidativo, outra isoforma da glutathione S transferase (GST22), diferente da GST8 que foi mais abundante no sensível, o mesmo observado para a proteína adaptadora 14-3-3. Essa proteína está envolvida em mecanismos de sinalização celular. Outras duas proteínas foram menos abundantes no tolerante: *Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein* (PCD/LT) e uma proteína não caracterizada (LOC100784424).

Na figura 6 estão representados os *spots* que apresentaram abundância diferencial em raízes do tratamento de déficit moderado (-1,0 MPa) e que foram retirados para análise por MS e detecção por MS/MS. O número de identificação de cada um dos *spots* indicado no gel bidimensional permite a verificação da abundância relativa de cada *spot* na tabela 1 (material suplementar) que estão identificados pelo Match ID.

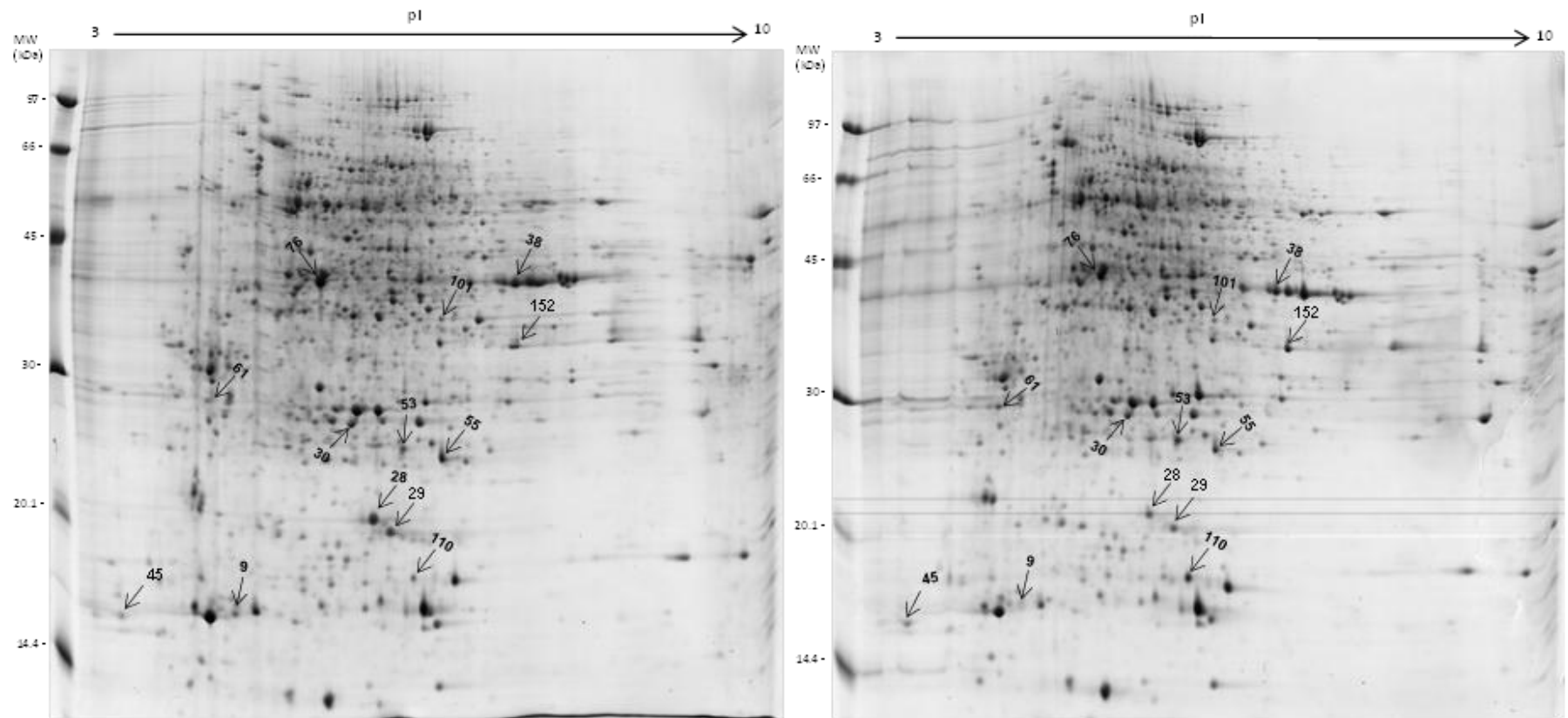


Figura 6. Proteínas de raízes de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao cultivar sensível (BR 16) sob condições de déficit moderado (-1,0 MPa). As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 3-10, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com *Coomassie* coloidal. A expressão diferencial foi analisada no *software ImageMaster 2D Platinum*.

3.1.3 Proteínas diferencialmente expressas sob déficit severo nos genótipos contrastantes

Quando analisadas as proteínas diferencialmente expressas nos genótipos contrastantes na presença de déficit severo verifica-se que dos 41 *spots* diferenciais, 40 foram identificados e corresponderam a 23 diferentes proteínas (Tabela 3, material suplementar).

O cultivar tolerante apresentou um aumento da abundância relativa em 37 proteínas e redução da expressão apenas em quatro proteínas. De forma geral, observou-se um aumento na expressão de proteínas que participam de variados processos que podem contribuir para conferir tolerância a seca nesse cultivar, tais como: ciclo oxidativo das pentoses fosfatadas e glicólise (*spots* 9, 34, 13, 14, 15, 16, 17, 33, 219, 220, 380 e 100), ciclo de Krebs (*spots* 8, 10, 11 e 12), outras também associadas à respiração (*spots* 203 e 280), metabolismo antioxidativo (*spots* 22, 45 46, 35, 36, 37, 25 e 26), metabolismo de aminoácidos (*spot* 44), metabolismo do fósforo (*spots* 41 e 42), metabolismo secundário (*spots* 59, 161, 144 e 124), regulação (*spots* 40, 43 e 218) e reserva (*spot* 32) (Figura 7). Houve redução em apenas quatro proteínas que estão envolvidas no metabolismo antioxidativo (*spot* 200 e 300), metabolismo secundário (*spot* 390) e uma não identificada por MS (Figura 7).

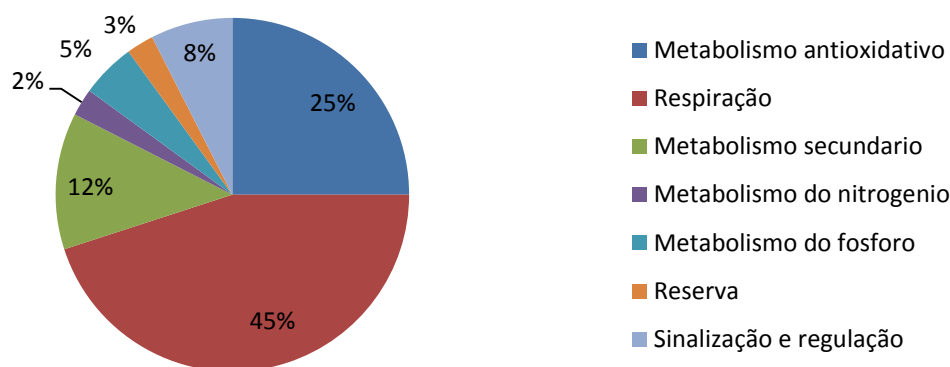


Figura 7. Classificação funcional de proteínas de raízes de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao cultivar sensível (BR 16) sob condições de déficit severo (-1,5 MPa). Classificação baseada no catalogo de informações de proteínas UniProt (Universal Protein Resource).

Na figura 8 é possível verificar a expressão relativa das proteínas diferencialmente expressas de acordo com a função ou metabolismo envolvido. A abundância relativa foi normalizada pelo cultivar sensível.

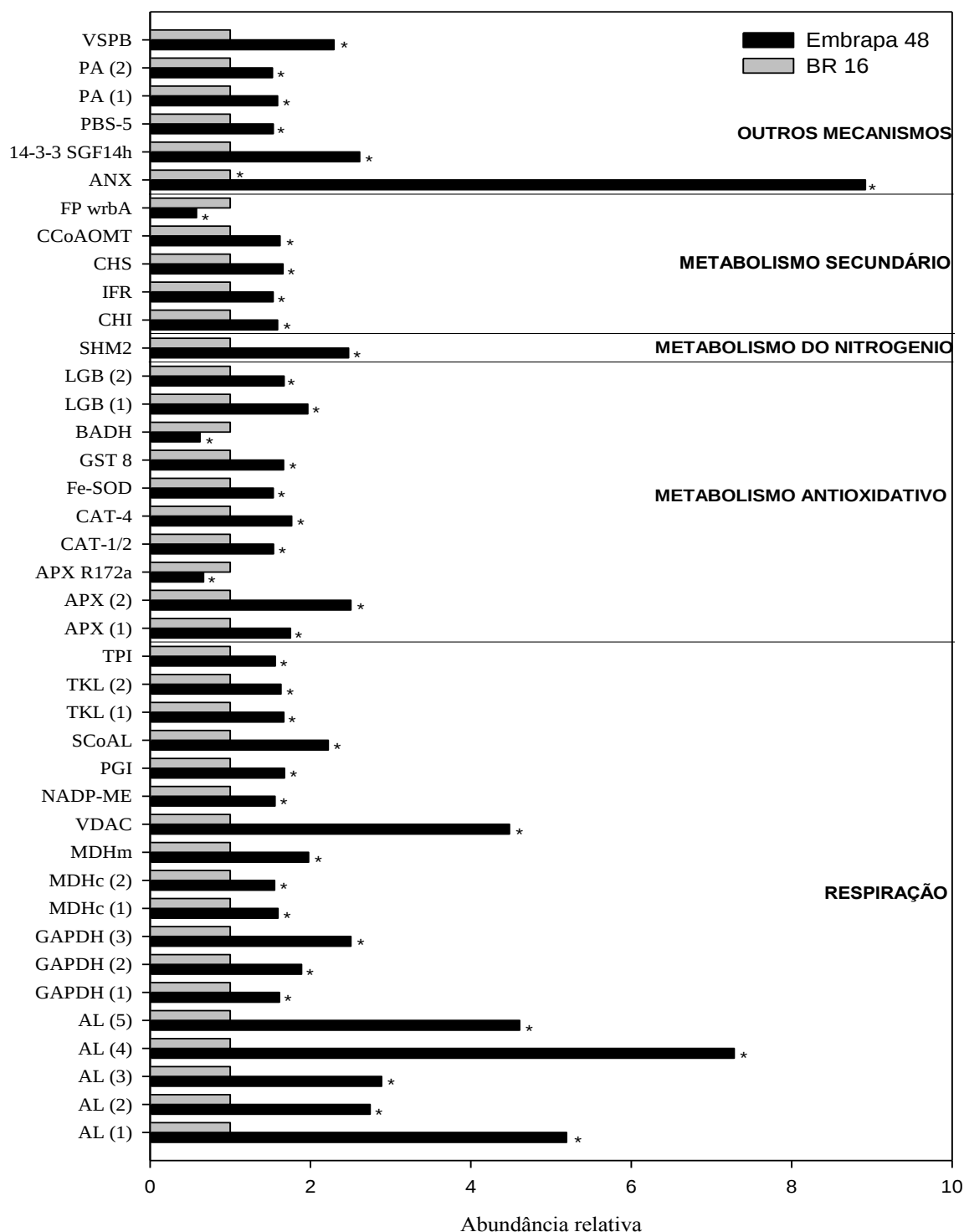


Figura 8. Expressão relativa de proteínas diferencialmente expressas na presença de déficit severo (-1,5 MPa). Abundância relativa normalizada pela cultivar sensível (BR16). Triose fosfato isomerase (TPI), Aldolase (AL), Succinil-CoA ligase (SCoAL), Enzima málica dependente de NADP (NADP-ME), Superóxido dismutase (Fe-SOD), Catalase (CAT), Cafeoil-CoA metiltransferase (CCoAOMT), Anexina (ANX), Proteína adaptadora 14-3-3 (14-3-3 SGF14h), Hidroximetiltransferase (SHM2), Precursor da fosfatase ácida (PA), Putative beta5 proteasome subunit (PBS-5), Chain X, Ascorbate Peroxidase R172a Mutant (APX R172a), Fosfoglicerato cinase (PGK), Transcetolase (TKL), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Malato desidrogenase (MDH), Peroxisomal voltage-dependent anion-selective channel protein (VDAC), Ascorbato peroxidase (APX), Glutathione S transferase (GST-8), Leghemoglobina (LGB), Chalcona isomerase (CHI), NAD(P)H-dependent 6'-deoxychalcone synthase (CHS), Isoflavona redutase (IFR), Peroxisomal betaine-aldehyde dehydrogenase (BADH). * indica aumento ou redução na % volume (P<0,05).

Várias enzimas respiratórias tiveram incrementos significativos nas raízes do cultivar tolerante sob estresse hídrico severo. A PGK teve sua abundância relativa aumentada no cultivar tolerante em relação ao sensível, fato também verificado na ausência de estresse (Figura 2). A TKL apresentou maior abundância nas raízes de plantas sob déficit severo da cultivar tolerante em duas possíveis isoformas. Em relação a proteína triose fosfato isomerase (TPI) um aumento da abundância no cultivar tolerante foi observado. A GAPDH também foi mais abundante no cultivar tolerante, o que ocorreu para três isoformas dessa proteína. Três isoformas da malato desidrogenase (MDH), uma mitocondrial e duas citoplasmáticas tiveram maiores níveis no cultivar tolerante. Enzimas da superfamília aldolase apresentaram maior expressão no cultivar tolerante sob déficit severo, evidenciado pela presença de cinco *spots* de possíveis isoformas dessa enzima. Outra enzima que teve maior abundância no cultivar tolerante foi a enzima respiratória succinil-CoA ligase (SCoAL). Essa é uma importante enzima do ciclo dos ácidos tricarboxílicos que catalisa a formação de succinato para cadeia respiratória (Studart-Guimarães et al., 2005). Assim como no déficit moderado a proteína VDAC teve aumento no tolerante. Outra proteína da respiração com aumento na abundância no tolerante é a enzima málica dependente de NADP (NADP-ME). Essa enzima é responsável pela descarboxilação do oxaloacetato a piruvato (Ácido orgânico de 4 carbonos).

Várias proteínas do mecanismo antioxidativo tiveram maior abundância relativa nas raízes do cultivar tolerante sob estresse hídrico severo. Maior abundância da enzima ascorbato peroxidase (APX) em 2 possíveis isoformas. Essa proteína é uma das principais enzimas envolvidas no sistema de desintoxicação de espécies reativas de oxigênio nas plantas, catalisando a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (Guzzo; Harakava, 2007; Polle, 2001). A enzima superóxido dismutase (Fe-SOD) foi outra enzima que foi mais abundante no cultivar tolerante. Ela catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Devido a isto, é uma importante via de defesa antioxidante na maioria das células expostas as espécies reativas de oxigênio. Existem várias isoformas de SOD variando em seus cofatores, podendo ser: cobre, zinco, manganês, ferro ou níquel. A isoforma encontrada nesse estudo foi a Fe-SOD. A enzima catalase (CAT) apresentou maior abundância no cultivar tolerante no déficit severo, evidenciado pela presença de dois *spots* sendo duas possíveis isoformas dessa enzima. A CAT é uma enzima intracelular, encontrada na maioria dos organismos, que decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) segundo a reação química: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. Esta enzima encontra-se nos peroxissomas em animais e plantas e

também nos glioxissomas (apenas em plantas) e no citoplasma de procariontes. Pertence à subclasse das enzimas oxidoredutases que usam o peróxido como aceptor de elétrons e também como doador de elétrons. A catalase é, portanto, uma peroxidase (Kirkman & Gaetani, 2007). A enzima GST-8 foi identificada como diferencialmente expressa com aumento significativo no cultivar tolerante, resposta similar observada sob déficit moderado para a mesma isoforma. Com relação as proteínas do metabolismo antioxidativo e relacionadas a fixação simbiótica de nitrogênio, verificou-se maior abundância relativa da proteína LGB. Foram identificados dois *spots* diferencialmente expressos, indicando serem isoformas dessa proteína.

O metabolismo secundário foi o terceiro grupo mais representativo na resposta ao déficit severo. A enzima Cafeoil-CoA metiltransferase (CCoOAMT) foi mais abundante nas raízes de plantas tolerante. Esta enzima está envolvida na biossíntese de lignina, catalisando a metilação dos ésteres cafeoil CoA e 5-hidroxiferuloil CoA a feruloil CoA e sinapoil CoA, respectivamente, que são reações intermediárias no processo da biossíntese da lignina ou dos flavonóides (Ferrer et al., 2005). Outras proteínas do metabolismo secundário que também sofreram aumentos na abundância foram CHI e CHS, enzimas relacionadas com a biossíntese de flavonoides, que também foram mais abundantes no cultivar tolerante na presença de estresse moderado. A IFR também se apresentou mais expressa no genótipo tolerante. Essa enzima é específica da via de biossíntese dos isoflavonoides (Zabala et al., 2006) e é encontrada tipicamente em leguminosas. Ela catalisa uma redução dependente de NADPH, envolvida na biossíntese de compostos derivados da via dos fenilpropanoides.

No grupo das proteínas de reserva, foi evidenciado aumento da abundância relativa da proteína VSPB na condição de déficit severo no cultivar tolerante.

A proteína anexina (ANX), pertencente ao grupo das proteínas de sinalização, foi evidenciada como diferencial apenas no déficit severo, com alta abundância no cultivar tolerante. ANXs fazem parte de uma família multigênica que se ligam à membrana e são dependentes de cálcio. Estão presentes principalmente no citoplasma ou em membranas intracelulares (Kovács et al., 1998) e exerce função de sinalização celular. Outra proteína relacionada a sinalização e localização é a proteína 14-3-3 SGF14h, que é uma proteína adaptadora regulando interação de proteínas alvo como cinases e fosfatses (Roberts & de Bruxelles, 2002), que foi mais abundante no tolerante na presença de déficit severo.

Algumas outras proteínas foram mais expressas nas raízes de plantas tolerantes, em relação as plantas sensíveis, no tratamento com déficit severo, como no metabolismo

de aminoácidos, serina hidroximetiltransferase (SHM2), no metabolismo do fosforo, precursor da fosfatase ácida (PA) e relacionada a proteólise, *putative beta5 proteasome subunit* (PBS-5).

Já as proteínas que foram menos abundante no cultivar tolerante pertencem aos grupos do metabolismo antioxidativo e metabolismo secundário. No metabolismo antioxidativo verificou-se menor abundância em duas proteínas: *Chain X*, *Ascorbate Peroxidase R172a Mutant* (APX R172a) e BADH.

Já no grupo do metabolismo secundário a flavoproteína wrbA apresentou menor abundância relativa sob deficit severo no cultivar tolerante.

Na figura 9 estão representados os *spots* que apresentaram abundância diferencial em raízes do tratamento de déficit severo (-1,5 MPa) e que foram retirados para análise por MS e detecção por MS/MS. O número de identificação de cada um dos *spots* indicado no gel bidimensional permite a verificação da abundância relativa de cada *spot* na tabela 3 que estão identificados pelo spot ID.

Tomados em conjunto, os resultados do proteoma diferencial de raízes dos cultivares contrastantes revelam uma modulação na expressão de proteínas, com destaque para enzimas respiratórias, proteínas do metabolismo antioxidativo e do metabolismo secundário, as quais se mostraram mais abundantes no cultivar tolerante tanto na condição irrigada como sob déficits. Essa modulação diferencial deve ser importante para mecanismos de tolerância e identifica potenciais candidatos a manipulação genética em soja com vistas à aumento na tolerância à seca.

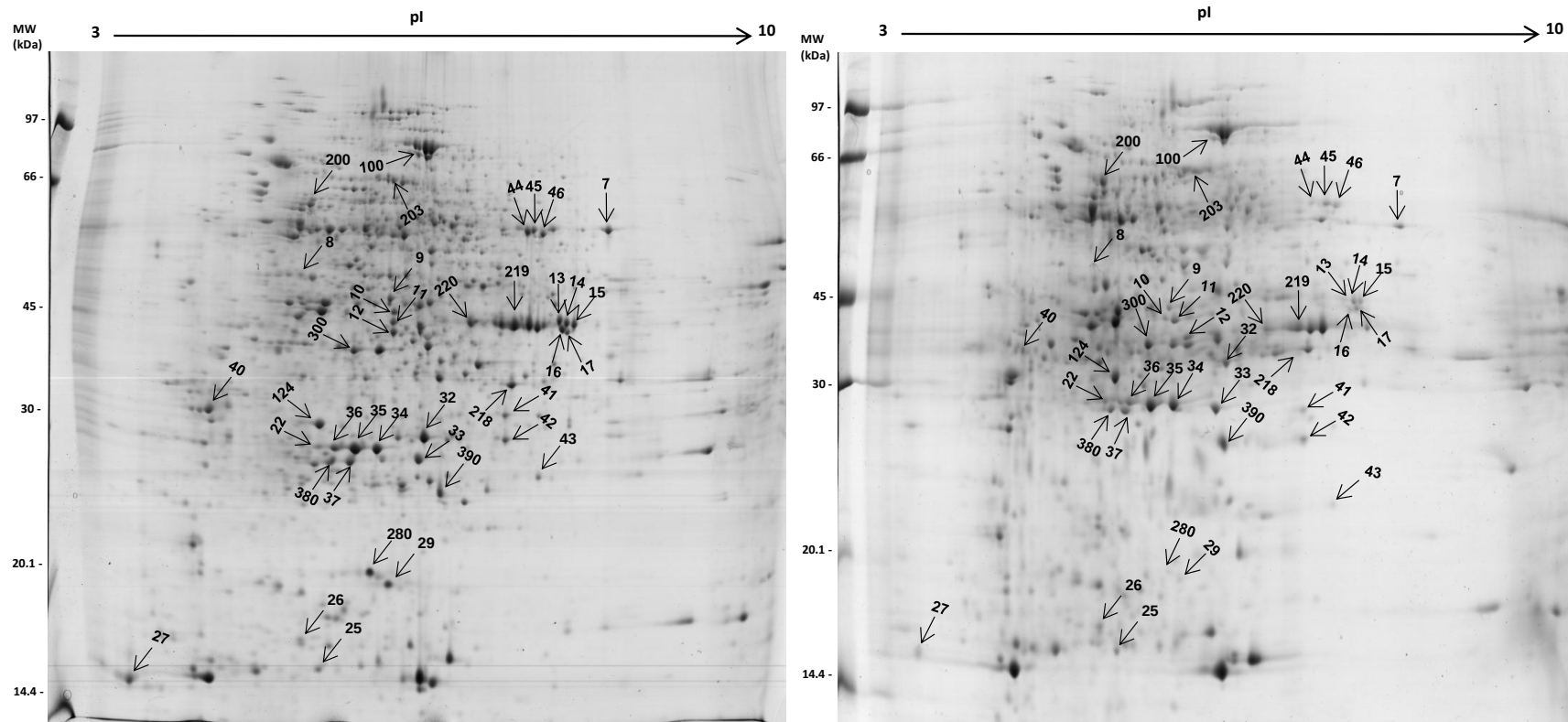


Figura 9. Proteínas de raízes de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao cultivar sensível (BRS 16) sob condições de déficit severo (-1,5 MPa). As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 3-10, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com *Coomassie* coloidal. A expressão diferencial foi analisada no *software ImageMaster 2D Platinum*.

3.2 Proteoma diferencial de proteínas responsivas ao déficit hídrico no cultivar tolerante (Embrapa 48)

As análises realizadas para o proteoma diferencial de proteínas responsivas ao déficit hídrico no cultivar tolerante seguiram o mesmo padrão, porém as comparações foram feitas para cada nível de déficit hídrico (-1,0 e -1,5 MPa) em comparação com o controle (irrigado), somente para o genótipo tolerante (Embrapa 48).

Em raízes do cultivar tolerante, (Embrapa 48), as proteínas responsivas ao déficit hídrico mostraram diferenças na sua abundância relativa. As imagens dos géis foram comparadas quanto à porcentagem de volume (% Volume) dos *spots* nas plantas submetidas ao déficit hídrico em relação ao controle (irrigado). Essas proteínas diferencialmente expressas são ditas responsivas ao déficit hídrico, devido apresentarem aumento ou diminuição na expressão em termos de abundância relativa.

Raízes do cultivar Embrapa 48 submetido ao déficit hídrico moderado (-1,0 MPa) apresentaram 23 proteínas com abundância diferencial em relação ao controle. Dessas, sete foram reduzidas e 16 foram aumentadas em resposta ao déficit hídrico moderado (Tabela 4, material suplementar).

Observa-se, pela distribuição funcional, que houve uma predominância de proteínas responsivas ao déficit moderado dos grupos do metabolismo antioxidativo, da respiração e do metabolismo de aminoácidos (Figura 10).

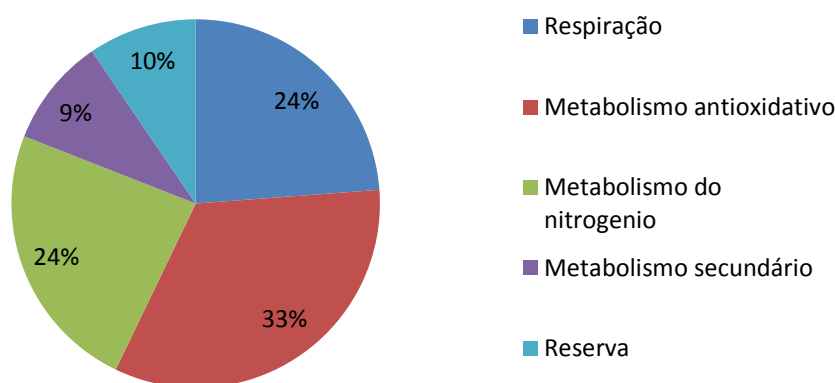


Figura 10. Classificação funcional das proteínas de raízes de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) quando submetido ao *deficit* moderado (- 1,0 MPa).

Não obstante, em raízes do cultivar Embrapa 48 na presença de déficit hídrico severo (-1,5 MPa) apresentaram 15 proteínas com abundância diferencial em relação ao controle. Desse total, 4 tiveram sua expressão reduzida e 11 aumentada com a imposição do déficit severo (Tabela 2, material suplementar). Pela distribuição

funcional, verifica-se que houve uma predominância de proteínas respiratórias e do metabolismo antioxidativo responsivas ao déficit severo (Figura 11). Enquanto que no estresse moderado houve expressão diferencial mais acentuada de proteínas do mecanismo antioxidativo do que da respiração (33 versus 24%, respectivamente), no estresse severo houve uma equivalência da expressão diferencial destas duas classes (38 versus 38%, respectivamente).

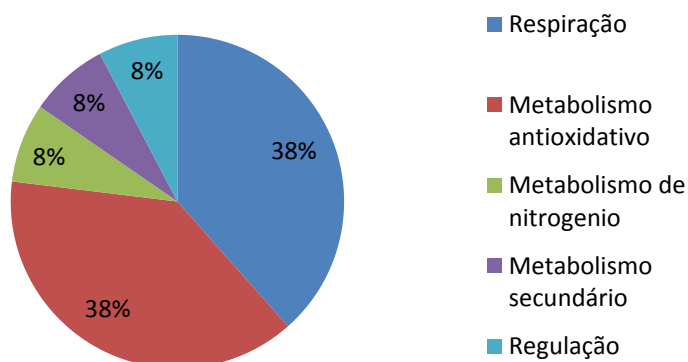


Figura 11. Classificação funcional das proteínas de raízes de soja com expressão diferencial no cultivar tolerante (Embrapa 48) quando submetido ao *deficit* severo (-1,5 MPa).

Várias enzimas do mecanismo antioxidativo tiveram maior expressão sob estresse hídrico, envolvendo dois subgrupos, proteínas de degradação de radicais livres e chaperonas. Com relação ao grupo de proteínas do metabolismo antioxidativo, a enzima GST8 foi identificada como responsiva ao déficit hídrico apresentando um aumento significativo no cultivar tolerante quando imposto déficit moderado em comparação com o controle irrigado (Figura 12). Esta enzima possui as funções biológicas de desintoxicação e resposta ao estresse. A enzima CAT apresentou maior expressão no cultivar tolerante no déficit severo em relação ao controle irrigado, evidenciado pela presença de dois *spots* (*spots* 45 e 46) sendo duas possíveis isoformas dessa enzima (Figura 12). Houve um aumento na expressão de uma chaperona (HSP 70 kDa), tanto sob déficit moderado quanto severo em relação ao controle irrigado do cultivar tolerante (Figura 12). A enzima NDPK foi reprimida no cultivar tolerante em relação ao controle irrigado quando na presença de déficit severo, apresentando uma redução na abundância relativa quando imposto o déficit severo (Figura 12). Verificou-se aumento de expressão da proteína LGB na condição irrigada nas plantas tolerantes submetidas ao déficit moderado. Foram identificados três *spots* diferencialmente expressos, indicando serem isoformas dessa proteína (Figura 12). Essa proteína fornece oxigênio para os bacteróides ou participa na eliminação de superóxido (Becana &

Klucas, 1992). A proteína *luminal-binding protein 4-like* (BIP-4), também foi responsiva aos déficits moderado e severo, e faz parte das proteínas do mecanismo antioxidativo, agindo como uma chaperona molecular para re-empacotar as proteínas desnaturadas pelas consequências do estresse oxidativo (Figura 12).

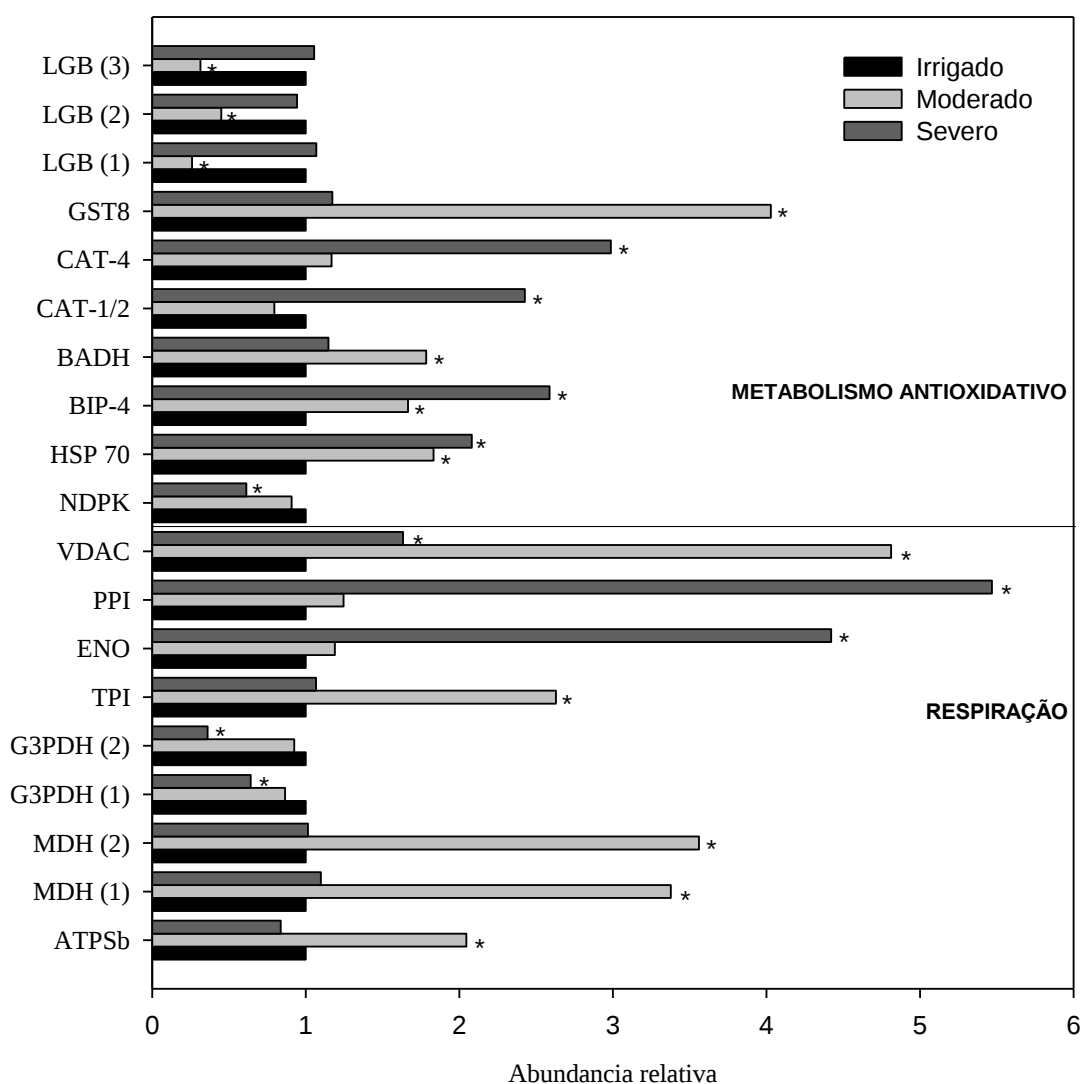


Figura 12. Expressão relativa de proteínas diferencialmente expressas responsivas aos déficits hídrico moderado (-1,0 MPa) e severo (-1,5 Mpa) no cultivar tolerante. Abundância relativa normalizada para o controle irrigado. ATP sintase mitocondrial (ATPSb), Malato desidrogenase (MDH), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), Triose fosfato isomerase (TPI), Enolase (ENO), Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1-like (PPI), Peroxisomal voltage-dependent anion-selective channel protein (VDAC), Nucleosídeo difosfato cinase (NDPK), Heat shock 70kDa (HSP70), Luminal-binding protein 4-like (BIP-4), Peroxisomal betaine-aldehyde dehydrogenase (BADH), Catalase (CAT), Glutathione S transferase (GST-8), Leghemoglobina (LGB). * indica aumento ou redução na % volume ($P < 0,05$).

Como observamos para os metabólitos relacionados à respiração (Figura 15, capítulo 1), várias enzimas desta rota foram vistas novamente como responsivas ao déficit hídrico. Foi observado aumento da expressão da enzima ATP sintase subunidade alfa/beta nos géis das raízes de plantas sob déficit moderado do cultivar tolerante da ordem de 2 vezes. (Figura 12). Em relação a expressão da proteína TPI houve um aumento de expressão no cultivar tolerante no déficit moderado em relação ao seu controle irrigado da ordem de 2,63 vezes (Figura 12). Houve uma redução da expressão da enzima GAPDH na condição de déficit severo em relação ao controle irrigado no genótipo tolerante, sendo evidenciado pela presença de dois spots (Figura 12). A proteína NAD MDH, teve maiores níveis de expressão no cultivar tolerante na condição de déficit moderado, evidenciado pela presença de dois spots responsivos (Figura 12). A enolase (ENO) foi uma enzima altamente induzida pelo déficit severo (4,42 vezes) (Figura 12).

Nos géis 2D analisados a enzima GSbeta1 foi responsiva ao déficit moderado com aumento na expressão dessa proteína (Figura 13). Houve uma redução na expressão da proteína FDH quando sob déficit moderado no cultivar tolerante quando comparado ao controle irrigado (Figura 13).

Algumas enzimas do metabolismo secundário foram responsivas ao estresse. Um dos exemplos observados no primeiro capítulo relacionado a este metabolismo, envolvia intermediários da síntese de lignina ou flavonoides. A enzima CCoAOMT foi mais expressa nas raízes de plantas sob déficit moderado no cultivar tolerante (1,5 vezes) em comparação com seu controle irrigado (Figura 13). Foi verificada a presença de duas isoformas da família da proteína *Cobalamin-independent synthase* (MetE) em que houve um aumento na abundância relativa nas duas isoformas quando submetidas ao déficit moderado (Figura 13). A FP wrbA foi menos expressa no cultivar tolerante sob déficit severo em relação ao controle irrigado (Figura 13).

Nesse trabalho, foi evidenciado redução da expressão de duas isoformas da proteína VSPB em raízes de plantas submetidas ao déficit moderado no cultivar tolerante em relação ao controle irrigado (Figura 13).

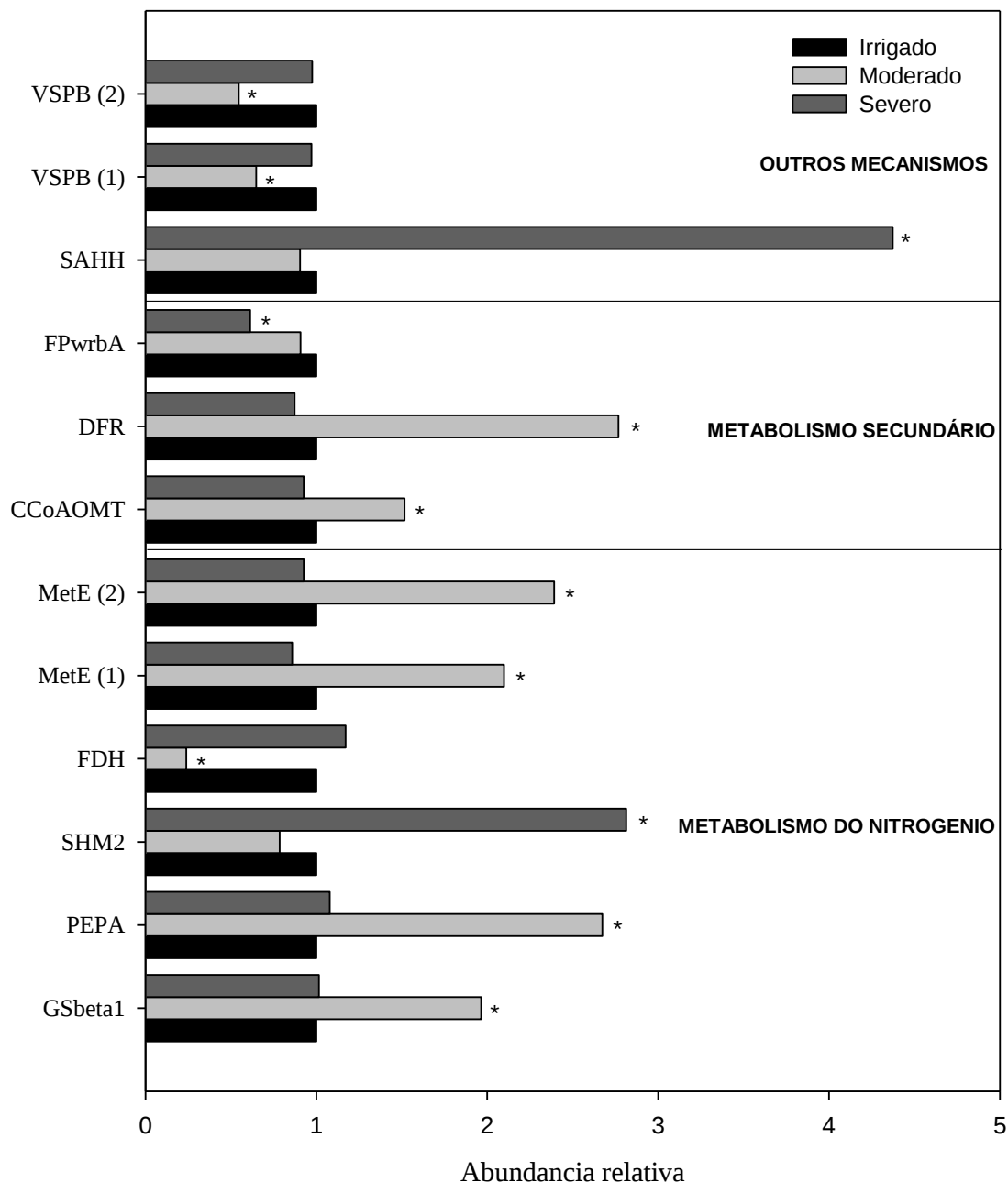


Figura 13. Expressão relativa de proteínas diferencialmente expressas responsivas aos déficits hídrico moderado (-1,0 MPa) e severo (-1,5 Mpa) no cultivar tolerante. Abundância relativa normalizada para o controle irrigado. Glutamina sintetase (GSbeta1), aminopeptidase (PEPA), Serine hydroxymethyltransferase 2 (SHM2), Formato desidrogenase (FDH), Cobalamin-independent synthase family protein (MetE), Cafeoil-CoA metiltransferase (CCoAOMT), Dihydroflavonol-4-reductase-like (DFR), Flavoprotein wrbA-like (FPwrbA), Adenosylhomocysteinase (SAHH), Precursor da glicoproteína de reserva (VSPB). * indica aumento ou redução na % volume ($P < 0,05$).

3.3 Alterações no padrão de fosforilação pela detecção com ProQ-Diamond em genótipos contrastantes de soja submetidos ao déficit hídrico

Em função da importância da fosforilação como modificação pós traducional de proteínas, nesse estudo foi realizada a detecção das fosfoproteínas pela utilização da coloração com corante fluorescente Pro-Q Diamond (Pro-Q DPS) que detecta fosfoproteínas por fluorescência e permite a detecção direta, em gel, de grupos fosfatados ligados a resíduos de serina, tirosina ou treonina. Vários estudos têm utilizado esta detecção para caracterizar proteínas alvos de fosforilação em amostras diferentes e complexas (Ke et al., 2009, Rosen et al., 2004, Schulenberg & Patton, 2004). Porém, a forma como os géis de fosfoproteínas são analisados ainda não segue um padrão para estudos fisiológicos comparativos em plantas. Nesse sentido, admitiu-se aqui que as proteínas marcadas como fosfoproteínas pela coloração com Pro-Q DPS, só fossem consideradas para identificação quando presentes nas três repetições biológicas, em todos os tratamentos. As imagens coradas com Pro-Q DPS foram sobrepostas às imagens coradas com *Colloidal Comassie* (CCB) e marcados os *spots* fosforilados para posterior retirada do gel. A partir desse ponto foi realizado a quantificação nas imagens dos géis corados com Pro-Q DPS pelo software *Image Master 2D platinum* e atribuído o tipo de regulação: positiva (+), quando a abundância relativa no cultivar tolerante foi maior em relação ao sensível; negativa (-), quando a abundância relativa foi menor e igual ou invariável (=), quando a diferença de expressão não foi significativa pela ANOVA a 5% de probabilidade.

Pela análise das imagens dos géis bidimensionais de raízes de soja corados com Pro-Q DPS foi detectado um total de 100 *spots* fosforilados quando comparados os genótipos tolerante (Embrapa 48) e sensível (BR 16) nos diferentes regimes hídricos (irrigado, déficit moderado e déficit severo). Destes, 95 puderam ser identificados por MS/MS.

No tratamento irrigado foram encontrados 38 *spots* marcados como fosforilados, sendo todos identificados (Figura 14). É interessante observar que 15 dessas proteínas fosforiladas também foram detectadas como diferencialmente expressas pelo proteoma diferencial (Figura 14). Das 23 com diferenças especificamente na fosforilação e não na abundância da proteína, 42,1 % foram mais fosforiladas e 23,7 % menos fosforiladas no tolerante na ausência do estresse e não foram verificadas diferenças na fosforilação em 34,2% das fosfoproteínas identificadas.

Foram detectados 29 *spots* fosforilados na presença de déficit moderado (Figura 14) e apenas uma proteína (GSbeta1) foi comum ao proteoma diferencial e ao

fosfoproteoma (Figura 14). Dessa forma, 28 foram marcadas como fosforiladas, e apenas 6,9 % menos fosforiladas, na presença de déficit moderado, não sendo verificadas alterações na abundância entre os cultivares em 6,9 % das fosfoproteínas.

Já na presença de déficit severo, 33 *spots* foram marcados como fosforilados (Figura 14 e 16). De maneira semelhante ao ocorrido na ausência de estresse hídrico, 14 proteínas fosforiladas também foram detectadas com abundância diferencial pelo proteoma diferencial (Figura 14 e 16). Das 19 proteínas marcadas apenas como fosforiladas, sem mudanças na abundância da proteína entre os genótipos sob estresse severo, 75,8 % foram mais fosforiladas e 9,1 % foram menos fosforiladas no genótipo tolerante, não sendo verificadas alterações na abundância entre os genótipos em 15,1 % das proteínas fosforiladas.

A identificação das proteínas foi realizada pelo auxílio do *software* Mascot, que apresentou valores de escores significativamente acima do limite mínimo de confiabilidade e foram confirmadas posteriormente pelo *software* Scaffold, com pelo menos 98 % de probabilidade, indicando alta confiabilidade na identificação das proteínas. O número de identificação de cada um dos *spots* indicado no gel bidimensional permite a verificação da abundância relativa de cada *spot* na tabela 3 (material suplementar) que estão identificados pelo Spot ID.

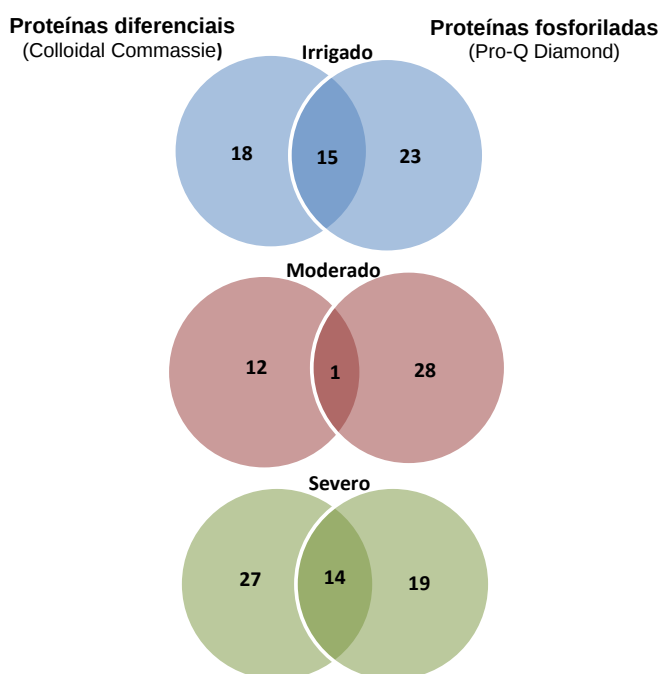


Figura 14. Análise do diagrama de Venn de proteínas diferencialmente expressas nos diferentes regimes hídricos e proteínas marcadas como fosforilada. Proteínas diferencialmente expressas pela revelação por Colloidal Comassie (CCB) e fosfoproteínas reveladas pelo corante Pro-Q Diamond (Pro-Q DPS).

3.3.1 Fosfoproteoma de raiz de soja nos genótipos contrastantes na condição irrigada

As proteínas marcadas como fosfoproteínas pela coloração com Pro-Q DPS, na ausência de déficits hídrico que apresentaram regulação positiva, ou seja, maior abundância relativa no cultivar tolerante em relação ao sensível foram: GAPDH (*spots* 20 e 21), MDH (*spot* 17), NDPK (*spot* 6), LGB (*spots* 1, 2 e 3), VSPB (*spots* 8 e 9), e duas proteínas não caracterizadas (*spots* 16 e 22). Cinco proteínas não foram detectadas pelo Pro-Q DPS no cultivar sensível: IFR (*spot* 18), proteína SAM22 (*spot* 5), FDH (*spot* 19), proteína PR1 (*spot* 4), e *NmrA-like negative transcriptional regulator family protein* (IFR, *spot* 118).

Já as proteínas marcadas como fosfoproteínas que apresentaram regulação negativa, ou seja, menor abundância relativa no cultivar tolerante em relação ao sensível foram: ATPSb (*spot* 50), frutocinase (FRK, *spot* 47), TPI (*spot* 35), GSbeta1 (*spot* 33), ACTIN (*spot* 49), e uma proteína não caracterizada (LOC100527208, *spot* 31).

Proteínas inequivocamente fosforiladas incluem dois grupos: o primeiro grupo inclui as proteínas que foram marcadas como fosfoproteínas, mas que não apresentaram diferenças na abundância relativa entre os genótipos (34,2%), compostas pelas proteínas frutose-bisfosfato aldolase (FBA, *spots* 24, 25 e 26), GPDH (*spots* 13, 23 e 27), Fe-SOD (*spot* 14), APX (*spots* 10 e 12), CHI (*spot* 15), *proteasome subunit alpha type-6* (*spot* 11) e duas proteínas não caracterizadas (LOC100499848 e LOC100799358, *spots* 7 e 41). O segundo grupo, inclui as proteínas que tiveram alguma alteração em sua abundância, mas não tiveram nenhuma fosforilação detectada no genótipo tolerante, como TPI (*spot* 35), ENO (*spot* 51), *adenosylhomocysteinase* (SAHH, *spot* 34), proteína relacionada a maturação (*ripening related protein*) (*spot* 32) e ACTIN (*spot* 49).

Uma correlação interessante diz respeito a algumas proteínas comuns ao proteoma diferencial e ao fosfoproteoma, na ausência de déficit. Com relação as enzimas respiratórias, a enzima ATPSb foi menos abundante no cultivar tolerante e apresentou menor grau de fosforilação. Essa menor abundância no tolerante pode estar associada ao menor nível de fosforilação tornando menos ativa, resultando em menor expressão da mesma. Já a enzima MDH também foi menos abundante no cultivar tolerante, porém foi mais fosforilada nessa condição. Nesse caso a fosforilação pode estar relacionada à ativação dessa enzima que por estar mais ativada resultaria em maior atividade enzimática e menor quantidade da proteína. Outra enzima respiratória comum nas duas análises é a NDPK e apresentou aumento na abundância tanto na proteína total como na fosforilação. Nesse caso a fosforilação poderia estar relacionada a maior

abundância na proteína total. A proteína de biossíntese de aminoácidos, GSbeta1, mostrou-se menos abundante tanto no nível de proteína total como no nível de fosforilação no cultivar tolerante. Já as proteínas do metabolismo secundário CHI, IFR e SAM22 foram mais expressas no tolerante, sendo que a CHI não mostrou alteração no nível de fosforilação e as proteínas IFR e SAM22 não foram detectadas no sensível, só sendo detectado fosforilação no cultivar tolerante (Tabela 3, material suplementar).

3.3.2 Fosfoproteoma em raízes de soja nos genótipos contrastantes sob déficit moderado

O cultivar tolerante Embrapa 48 em comparação com o cultivar sensível BR16 apresentou um total de 29 *spots* fosforilados, sendo que a fosforilação relativa foi maior em 25 *spots*, menor em dois *spots* e dois *spots* não apresentaram diferença na fosforilação entre os cultivares (Tabela 3, material suplementar). É interessante observar que apenas uma dessas proteínas fosforiladas também foi detectada pelo proteoma diferencial (GSbeta1), e que a maioria das proteínas foram diferenciais apenas no fosfoproteoma (Figura 14).

As proteínas marcadas como fosfoproteínas pela coloração com Pro-Q DPS que apresentaram regulação positiva foram: ATPS α/β (*spot* 71), NDPK (*spot* 54), GAPDH (*spots* 21, 23 e 66), TPI (*spot* 56), FBA (*spots* 64, 65 e 67), FRK (*spot* 70), 2,3-bisfosfoglicerato-independente (*spot* 72), GSbeta1 (GS) (*spot* 68), APX (*spot* 125), Fe-SOD (*spot* 59), Cobalamin-independent methionine synthase family protein (MetE, *spot* 73), CHI (*spot* 60), SAHH (*spot* 94), S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein (SAMDMT, *spot* 81) e proteínas não caracterizadas (LOC100500685, LOC100784252 e LOC100807342, *spots* 22, 52 e 62). Duas proteínas não foram detectadas pelo Pro-Q DPS no cultivar sensível: FRK (*spots* 69) e PGM (*spot* 72) (Figura 15).

Já as proteínas marcadas como fosfoproteínas pela coloração com Pro-Q DPS que apresentaram regulação negativa, ou seja, menor fosforilação relativa no cultivar tolerante em relação ao cultivar sensível foram duas: *MLP-like protein* 43 (MLP43, *spot* 53) e *MLP-like protein* 44 (MLP44, *spot* 55), sendo que MLP44 não foi detectada pelo Pro-Q DPS no cultivar tolerante (Figura 15).

As proteínas marcadas como fosfoproteínas, mas que não apresentaram diferenças na abundância relativa entre os genótipos, foram apenas duas, sendo as pelas proteínas GAPDH (*spot* 39) e outra não identificada por MS (*spot* 63) (Figura 15).

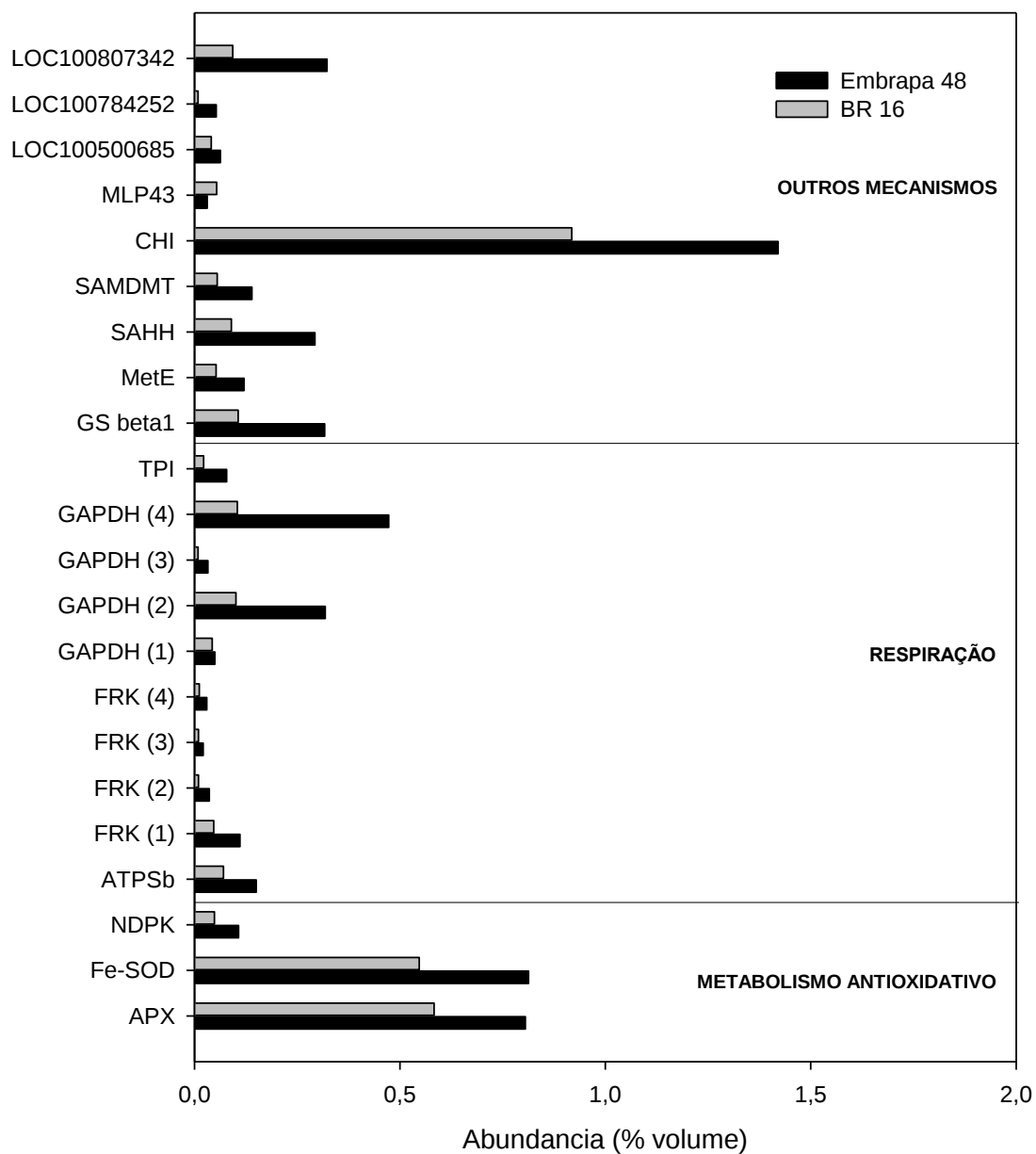


Figura 15. Fosforilação relativa (% vol) de fosfoproteínas nos genótipos contrastantes submetido ao déficit hídrico moderado (-1,0 MPa). Abreviações das proteínas segundo figuras 12 e 13.

3.3.3 Fosfoproteoma de raiz de soja nos genótipos contrastantes sob déficit severo

O cultivar tolerante Embrapa 48 em comparação com o cultivar sensível BR 16 apresentou um total de 33 *spots* fosforilados, com aumento na abundância relativa em 25 *spots*, redução em três *spots* e cinco *spots* não apresentaram diferença na fosforilação (Tabela 3, material suplementar).

As proteínas marcadas como fosfoproteínas pela coloração com Pro-Q DPS que apresentaram regulação positiva no tolerante foram: GAPDH (*spots* 20, 84 e 86), MDH (*spots* 126, 127 e 128), NDPK (*spot* 75), TPI (*spot* 33), PGM, 2,3-bisfosfoglicerato-independente (*spots* 99 e 100), SAMDMT (*spot* 81), VSP (*spot* 32), MLP43 (*spot* 74) e uma proteína não caracterizada (LOC100807342, *spot* 22) (Figura 16).

Já as proteínas marcadas como fosfoproteínas que apresentaram regulação negativa foram apenas três: PGM (*spot* 80), MLP44 (*spot* 76) e *copper ion binding; cobalt ion binding; zinc ion binding* (CCZIB, *spot* 79) (Figura 16).

Proteínas que tiveram seu grau de fosforilação alterado e associadas à resposta ao estresse hídrico severo podem ser divididas em dois grupos. Primeiro, o grupo de proteínas marcadas como fosfoproteínas pela coloração com Pro-Q DPS, mas que não apresentaram diferenças na abundância relativa entre os genótipos. Este grupo inclui cinco proteínas: glutamina sintase clone R1 (*spot* 91), O-metiltransferase1 (OMT, *spot* 92), *Cytosol aminopeptidase family protein* (*spot* 93), *NmrA-like negative transcriptional regulator family protein* (IFR, *spot* 83), e SAHH (*spot* 94). Segundo, inclui as proteínas que não foram fosforiladas no genótipo sensível, mas foram no genótipo tolerante, e que tiveram alguma mudança no nível de abundância, e incluem 10 proteínas: aldolase (*spots* 101, 102, 103, 104 e 105), Lactato/malato desidrogenase (LMDH, *spot* 88), ADH (*spot* 89), GST (*spot* 78), IFR (*spot* 82), *Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein* (OXZDH, da família da ADH, *spot* 87) (Tabela 3, material suplementar).

No que diz respeito às enzimas respiratórias, todas as comuns ao proteoma diferencial e ao fosfoproteoma foram mais abundantes no cultivar tolerante. As proteínas englobavam cinco enzimas da família das aldolases, três isoformas da GAPDH, três isoformas da MDH e a TPI. Nesse caso, a fosforilação poderia estar envolvida no maior nível de atividade dessas enzimas respiratórias. A enzima do metabolismo antioxidativo GST e a VSPB apresentaram o mesmo comportamento das enzimas respiratórias, mais abundante, e diferencialmente mais fosforiladas no tolerante.

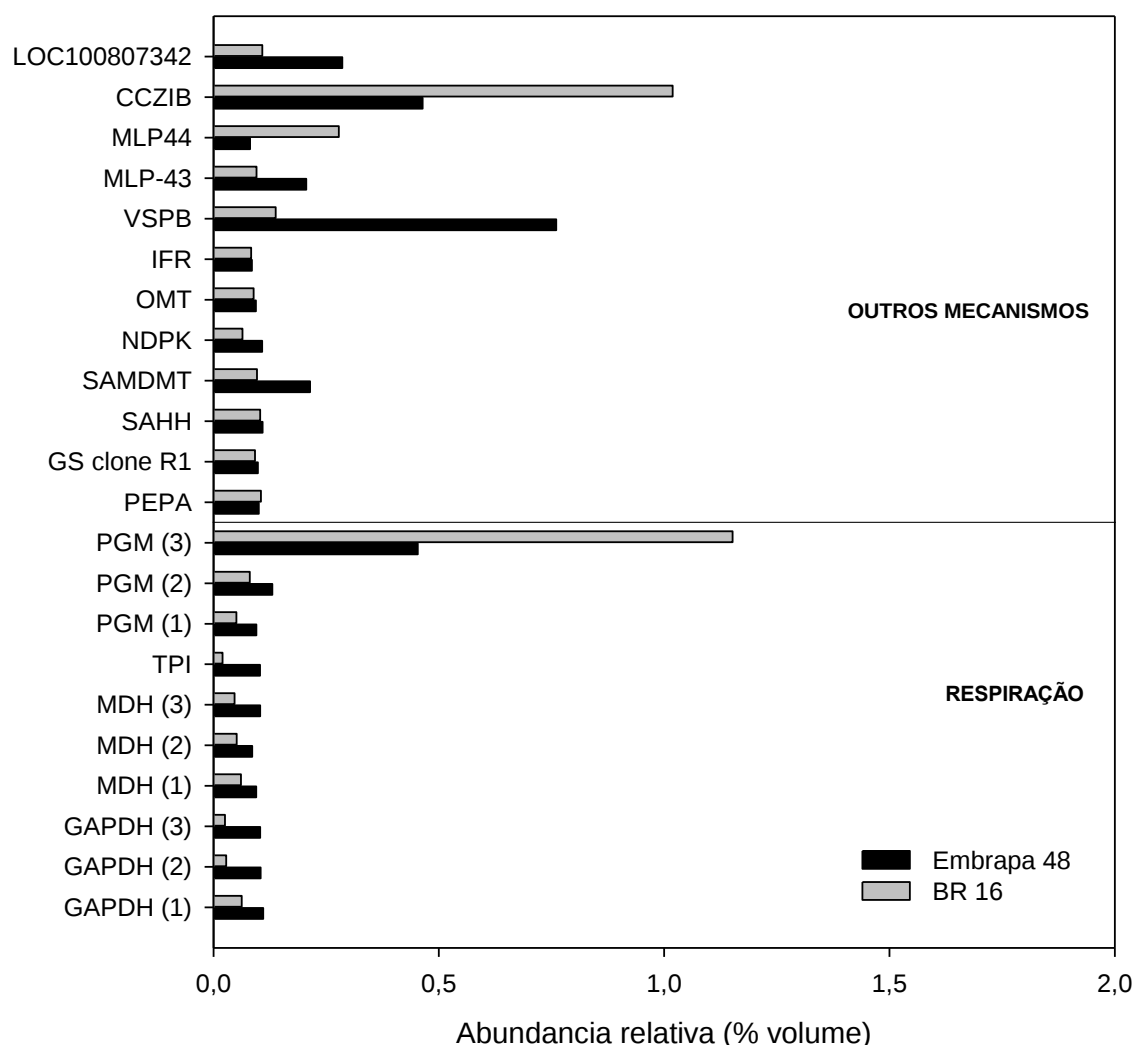


Figura 16. Expressão relativa (% vol) de fosfoproteínas nos genótipos contrastantes submetidos ao déficit hídrico severo (-1,5 MPa). Abreviações das proteínas segundo figuras 12 e 13.

3.3.4 Fosforilações induzidas no cultivar tolerante Embrapa 48.

Analisando as proteínas marcadas como fosforiladas pela coloração com Pro-Q DPS no cultivar tolerante, é possível inferir que, de forma geral, houve uma indução da fosforilação nas enzimas respiratórias com a imposição dos déficits hídricos. Em algumas enzimas houve uma forte indução na fosforilação no déficit moderado, não sendo mais detectada fosforilação no déficit severo, como ocorrido nas proteínas ATPSb, FRK2 e GAPDH. Já a enzima FBA, teve fosforilação fortemente induzida apenas no déficit severo. As enzimas TPI e PGM só apresentaram fosforilação na presença de déficits, não sendo detectado na condição irrigada (Figura 17).

Com relação às enzimas do metabolismo antioxidativo que apresentaram fosforilação em resposta ao déficit hídrico, foi encontrado uma resposta interessante

para as enzimas APX e Fe-SOD. Enquanto a APX foi fortemente induzida sob déficit moderado e não foi verificada fosforilação no déficit severo, a enzima Fe-SOD teve os níveis de fosforilação diminuídos sob déficit moderado, não sendo mais detectada fosforilação no déficit severo. No caso da enzima NDPK ocorreu um aumento da fosforilação no déficit moderado e manutenção desse nível no déficit severo (Figura 17). Esse resultado sugere que a fosforilação nessas enzimas é uma resposta mais imediata com a imposição do déficit hídrico no cultivar tolerante, fato esse que condiz com nossa hipótese mecanismos de percepção imediata do déficit.

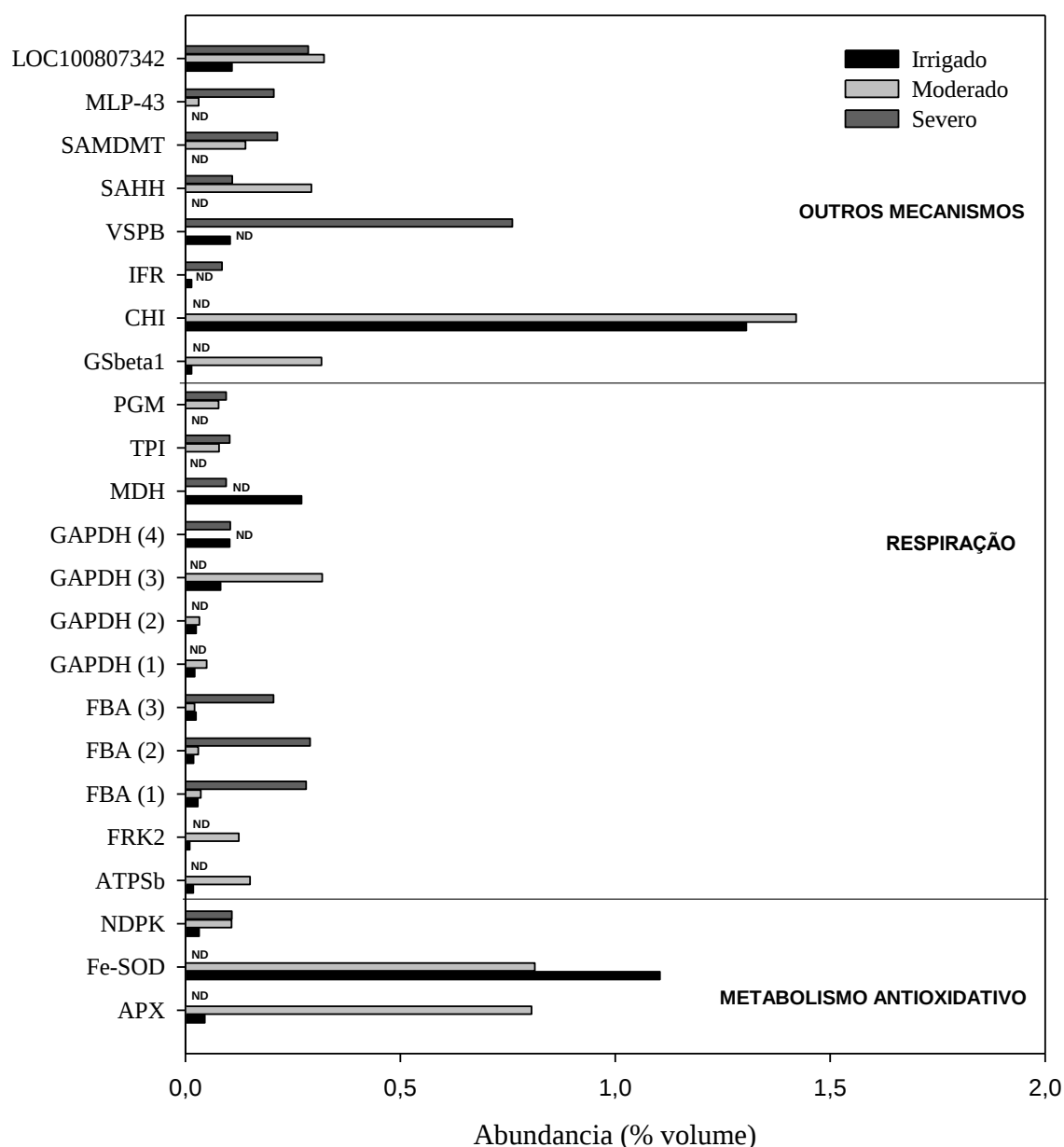


Figura 17. Expressão (% vol) de fosfoproteínas responsivas aos déficits hídricos moderado (-1,0 MPa) e severo (-1,5 MPa) no cultivar tolerante (Embrapa 48). Abreviações das proteínas segundo figuras 12 e 13.

4. DISCUSSÃO

4.1 Proteoma diferencial das raízes entre os cultivares tolerante (Embrapa48) e sensível à seca (BR16)

4.1.1 Proteoma diferencial das raízes na ausência de estresse hídrico

As proteínas PR1 e SAM22 foram as proteínas com maior expressão no cultivar tolerante em relação ao sensível na condição irrigada (aproximadamente 18 e 6,5 vezes, respectivamente). Por outro lado, ambas não foram responsivas ao déficit hídrico no cultivar tolerante. SAM22 é codificada pelo gene Glym 4 e é relacionada a patogênese (Crowell et al., 1992). Sua maior expressão pode estar relacionada com os mecanismos de defesa basal da planta contra patógenos, e como são componentes do sistema de sinalização que controla a expressão das PR, podem estar relacionadas com a alteração da expressão desta outra proteína. Xiong & Yang (2003) verificaram que resistência a doenças mediada pelas proteínas PR1 e PR10, e a tolerância a estresses abióticos como seca, salinidade e frio, são inversamente modulados por *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK) induzidas por ABA em arroz. Algumas evidências suportam a hipótese de que estas proteínas tem um papel na tolerância a estresses abióticos (Gaudet et al., 2000; Kwon et al., 2007). Estudos realizados por Lee et al. (2008) mostraram que tanto os parâmetros morfofisiológicos, quanto proteínas PR induzidas em condições de seca, ajudam as plantas a resistir e se recuperar de estresses abióticos moderados. Adicionalmente, em estresses severos, o efeito benéfico pode não operar e o acúmulo dessas proteínas pode ter efeito negativo no crescimento da planta. Sua maior expressão no cultivar tolerante pode, assim, estar relacionada ao maior volume radicular desta espécie na ausência do estresse.

Entretanto, mais notável é uma alteração na expressão de um número significativo de proteínas de função semelhantes, como observamos para as enzimas da respiração. Enquanto proteínas como a PGK (glicólise) e TKL (ciclo oxidativo das pentoses) foram mais expressas no genótipo tolerante, outras como ATPSb (fosforilação oxidativa), MDH (Ciclo de Krebs), TAL (ciclo oxidativo das pentoses) e ADH (fermentação) foram mais expressas no cultivar sensível, ambos na ausência do estresse hídrico. Observei no primeiro capítulo que o cultivar sensível possuía concomitantemente, menor volume radicular, maiores níveis de amido e sacarose nas raízes, associado a menores níveis de malato (apesar de ter maior expressão de MDH), succinato e fumarato. Considerando simultaneamente que maior crescimento radicular indica maior demanda de ATP e maior fluxo glicolítico, maior acúmulo de substâncias de reserva na raiz (sacarose e amido) e menores níveis dos três intermediários do Ciclo

de Krebs citados ocorreram no genótipo sensível, podemos postular que haveria um menor fluxo glicolítico no genótipo sensível. O fato do maior nível de ADH ocorrer também neste genótipo, e a expressão deste gene estar regulada pelo nível de piruvato no citosol, poderíamos sugerir uma maior atividade da fermentação neste cultivar, resultando em menor quantidade de substratos para o Ciclo de Krebs no genótipo sensível, explicando os menores níveis de seus intermediários citados acima. Normalmente o aumento da fermentação ocorre quando há uma queda no Ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, levando ao aumento de piruvato no citosol (Fante et al., 2009). Estes dados apontam que os maiores níveis de algumas proteínas respiratórias não foram relacionados com o maior crescimento e fluxo glicolítico em raízes na ausência do estresse hídrico.

Enquanto o genótipo sensível apresentou maiores níveis de proteínas chaperonas, como a BIP-4 e HSP70, as quais são induzidas em presença de maiores danos oxidativos, o mesmo apresenta menor nível de LGB, proteínas aptas a reduzir o nível de radicais livres. Ambos os fatos podem sugerir um maior estresse oxidativo no cultivar sensível, mesmo na ausência de estresse hídrico. Além disso, ocorre também aumento na quantidade desta proteína sob déficit moderado no cultivar tolerante. Essa proteína é indispensável no processo de fixação do nitrogênio nos nódulos de bacteroides simbiotes (Mureau et al., 1995; Dakora, 1995; Pupo & Davis, 1995). Alternativamente a LGB também pode reagir com H_2O_2 para formar Lb (IV) (Dakora, 1995). Foi descoberto que em plantas de fumo a superexpressão de algumas classes de hemoglobinas vegetais não simbióticas (nsHGBs) levava à redução de sintomas necróticos (Garrocho-Villegas et al., 2007), assim como essas nsHGBs exercem atividades semelhantes àsquelas com ação de peroxidases (Hoy & Hargrove, 2008) e também que sua superexpressão em *Arabidopsis* levava ao aumento da resistência à diversas doenças (Thiel et al., 2011). Estes resultados sugerem uma maior capacidade antioxidativa nas raízes da cultivar Embrapa 48, mesmo na ausência do estresse hídrico. Contudo, não observamos diferenças no teor de MDA nas raízes entre os genótipos em nenhum tratamento. Entretanto, dano oxidativo pode ocorrer em diferentes moléculas, como proteínas (proteínas oxidadas), e não somente em membranas.

Observei que enquanto o genótipo tolerante teve menores níveis de expressão de GSbeta1 (1) e (2), há uma maior expressão da FDH (1) e (2), as quais participam na síntese de metionina. Entretanto, as FDHs também podem estar envolvidas no metabolismo anaeróbico dentro da mitocôndria (Suzuki et al., 1998). As homologias

encontradas não permitem associar estas proteínas especificamente a uma destas diferentes funções metabólicas. Por outro lado, o menor acúmulo de glutamina no cultivar Embrapa 48 se associa com a menor presença de GS. Como a glutamina é um aminoácido usado por transaminases para a síntese de outros aminoácidos, observou-se também que o genótipo sensível, que tem maiores níveis de glutamina, também possui maiores níveis de alanina, serina, glicina, treonina e asparagina. Isto pode significar que as raízes da variedade BR 16 (sensível) tenham maiores níveis de assimilação de nitrogênio e biossíntese de aminoácidos nas raízes. Isto poderia significar uma maior competição entre as duas rotas metabólicas em raízes no cultivar sensível, com prejuízo para a rota glicolítica e para o Ciclo de Krebs, os quais teriam mais intermediários desviados da respiração para a síntese de aminoácidos. Desta forma, muito da energia no cultivar sensível seria utilizado na assimilação e biossíntese de aminoácidos, reduzindo a disponibilidade de ATP para o crescimento radicular no cultivar sensível. Desta forma é plausível sugerir que um genótipo que deixa a maior parte da assimilação do nitrogênio para o sistema radicular, e menor para a parte aérea, pode apresentar maior crescimento radicular e com isto, menor crescimento da parte aérea. Isto poderia explicar o menor crescimento relativo da parte aérea no cultivar tolerante, considerando que menor energia seria utilizada na parte aérea neste cultivar para a biossíntese de aminoácidos.

O último grupo de proteínas diferencialmente expressas inclui algumas enzimas do metabolismo secundário como *12-o-phytodioneato redutase* (OPR2, síntese de jasmonato), CHS e CHI (rota do ácido chiquímico) e isoflavona redutase (IFR, síntese de flavonoides). Saliente-se que caso a maior expressão destas proteínas signifique maior atividade e fluxo do metabolismo secundário nestas rotas, haveria a necessidade de uma maior taxa do ciclo oxidativo das pentoses para fornecer eritrose-4P e NADPH para estas rotas, significando também maior demanda metabólica. O ácido jasmônico induz o metabolismo dos flavonóides e, portanto, a rota do ácido chiquímico (Yu et al., 2002), o que poderia explicar o aumento das enzimas citadas. Também observou-se pela análise do perfil metabólico, maiores níveis de cafeato no cultivar tolerante, um intermediário da síntese de flavonóides. Os flavonóides são compostos antioxidantes, e sua biossíntese ocorre a partir do ácido chiquímico. Correlação entre maiores níveis de flavonoides em raízes e resposta a seca também foi observada em alfafa (Kang et al., 2011). Estes dados também suportam a ideia de um mecanismo antioxidativo mais efetivo nas plantas tolerantes, mesmo na ausência do estresse.

4.1.2 Proteínas responsivas aos déficits hídricos, moderado e severo, no cultivar tolerante.

A análise conjunta somente no genótipo tolerante permitiu verificar que o aumento na expressão de uma proteína pode ser transiente com o estresse. No caso das enzimas respiratórias diferencialmente expressas, observamos o aumento transiente nos níveis da ATPSb, de MDH (1) e (2), da TPI e de uma possível porina da membrana externa da mitocôndria (VDAC), as quais foram mais expressas somente durante o estresse moderado. Estas mudanças ocorreram em paralelo com uma redução transiente, também somente no estresse moderado, nos níveis dois intermediários do Ciclo de Krebs: malato, succinato, fumarato e isocitrato. Isto pode significar um aumento da respiração, temporariamente, o qual seria maior sob estresse moderado. Aumentos transientes da respiração em resposta ao estresse já foram também observados em outros estudos (Galle et al., 2009, Ribas-Carbo et al., 2005). Uma explicação poderia ser o aumento contínuo dos osmólitos, como o aumento de aminoácidos com o estresse, significando tanto uma demanda extra de energia para sua biossíntese, como também para o seu armazenamento no vacúolo. Outras evidências que suportam esta hipótese é que há, também, um aumento transitório da GS e da sintase da metionina independente da cobalamina (MetE, síntese de metionina) no cultivar tolerante somente sob estresse hídrico moderado. Adicionalmente, podemos antever uma maior demanda respiratória transitória quando vemos também um aumento transitório, também sob estresse moderado, de duas enzimas da síntese de flavonóides e compostos fenólicos, os quais são importantes agentes antioxidantes, cuja expressão é também regulada por ABA (Hichri et al., 2011; Sharma et al., 2003). Mas as LGB, que tem uma redução transitória no estresse moderado, também tem uma função antioxidante.

Outro aumento transiente observado em paralelo, no cultivar tolerante, foi dos níveis de ABA, o qual ocorreu somente no tolerante, tanto em folhas como em raízes. Houve um aumento nos níveis de sacarose progressivamente com o estresse, e aumento da sacarose pode aumentar o acúmulo de ABA. De outro modo, ABA por si só pode também aumentar a respiração em frutos de morango, e o transcrito da succinato desidrogenase pode ser acumulado em resposta ao ABA (Böhmer & Schroeder, 2011; Aczevedo et al., 2013). Estes fatos sugerem um papel adicional do ABA em contribuir na resposta ao estresse hídrico: aumentar a respiração para permitir o maior crescimento radicular em resposta a deficiência de água no solo. Entretanto pode haver outras explicações para a redução da respiração sob estresse severo. Uma possível contribuição pode ser a maior redução do crescimento das raízes neste nível de estresse.

Adicionalmente, observamos, somente sob estresse hídrico severo, uma redução de duas isoformas da GAPDH, uma importante enzima glicolítica. O aumento progressivo do teor de glicose em raízes com o estresse neste genótipo poderia advir também de uma redução do fluxo glicolítico, o qual teria a função de permitir maior acúmulo de hexoses no vacúolo, para um ajuste osmótico mais efetivo sob estresse hídrico severo.

Os efeitos do estresse no acúmulo de proteínas dos mecanismos antioxidativos podem ser divididos em dois tipos. O primeiro envolve o aumento gradativo da expressão proteica, com o aumento gradativo do déficit hídrico. Este grupo inclui duas proteínas chaperonas moleculares (HSP70 e BIP4), e de duas isoformas da CAT. Isto indica uma progressão do dano oxidativo, embora os dados de MDA não suportem esta hipótese. O outro tipo de resposta envolve o aumento transiente da expressão proteica no estresse moderado, como observado para a enzima BADH, enzima da síntese da glicina-betaina, e da GST, enzima antioxidativa. Estes diferentes padrões de expressão sugerem que alguns mecanismos antioxidativos possam ser gradativos, e outros transitórios, durante a progressão do déficit hídrico.

Além da GS, outras três enzimas da síntese de aminoácidos respondem ao déficit hídrico neste genótipo, a SAHH, a *serine hydroxymethyltransferase 2* (SHM2) e a MetE. A primeira enzima participa principalmente do ciclo da síntese de SAM, a qual é utilizada para a síntese de etileno, putrescinas, biotina e nicotinamida. A biossíntese de etileno e putrescinas é induzida por seca e tem um papel também na promoção do desenvolvimento radicular (Morgan et al., 1990, Zeid & Shedeed, 2006). A segunda enzima pode participar da síntese de serina ou da degradação da glicina-betaina. No estresse moderado observamos tanto um aumento em glicina como serina. Este paralelismo sugere que o aumento da atividade desta segunda enzima esteja relacionado ao ajustamento osmótico em resposta ao estresse. A terceira enzima está envolvida na última reação da síntese de metionina. O maior nível desta enzima foi correlacionado com um aumento de mais de 10 vezes no teor de metionina no estresse moderado. Enquanto o teor de metionina aumenta gradativamente com a intensidade do estresse, o aumento de duas isoformas desta enzima é transiente, possuindo um maior nível de ambas as proteínas sob estresse moderado. Considerando que a SAHH é uma enzima do ciclo da SAM e é mais expressa sob estresse hídrico severo, e que o mesmo pode abastecer a rota de síntese de metionina, podemos explicar o aumento da metionina neste nível de estresse, mesmo com a redução da MetE, poderia haver um aumento da síntese de metionina pelo aumento de seus intermediários, outra explicação seria aquela

onde SAM seria usada para a síntese de etileno e putrescinas. Entretanto, estas duas proposições não são mutuamente excludentes.

O terceiro grupo de proteínas responsivas ao estresse engloba algumas enzimas do metabolismo secundário como a CCoAOMT e a dihidroflavonol-4-reductase (DFR). Estas também tem um aumento transitório no estresse hídrico moderado, e ambas participam na rota de síntese de flavonoides e de metabólitos antioxidativos. Este perfil concorda com as alterações transitórias de outros mecanismos antioxidativos descritos anteriormente.

4.1.3 Proteínas diferencialmente expressas entre os cultivares sob estresse moderado e associadas a tolerância a seca

Comparado com o estresse severo, foram detectadas 10 proteínas diferencialmente expressas sob nível moderado de estresse, sendo seis delas mais expressas no cultivar tolerante, e, assim, possivelmente associadas à tolerância a seca. Destas seis, duas são relacionadas à respiração: a VDAC e a enzima glicolítica GAPDH. Além destas duas, observamos a maior abundância de uma proteína importante da síntese de aminoácidos (GSbeta1) e uma enzima da síntese de flavonoides (CHS). A enzima GS é também uma proteína responsiva no genótipo tolerante e os maiores níveis desta correlacionam-se com os maiores níveis de glutamina no genótipo tolerante neste nível de estresse. Já o aumento da CHS indica o aumento do fluxo de síntese de flavonóides, importantes antioxidantes. Outras enzimas deste metabolismo são responsivas ao estresse hídrico neste cultivar, como mostrado anteriormente. As duas outras proteínas induzidas em maior nível no tolerante foram a flavoproteína wrba (altamente homologa aAt5g58800, NADPH-quinona oxidoreductase) e a GST8. A flavoproteína é uma NADPH-quinona oxidoreductase, a qual tem sido mostrada como importante em reagir com o superóxido, reduzindo o estresse oxidativo (Siegel et al., 2004). A GST8, uma importante enzima antioxidativa, também é induzida pelo estresse neste genótipo, mas transitoriamente, ao passo que a flavoproteína não é induzida por estresse, e o teor desta proteína reduz-se com o déficit severo. Em conjunto, estes resultados indicam que GST8 tem um papel importante como mecanismo antioxidativo sob estresse moderado, e que a menor redução nos teores da flavoproteína no genótipo tolerante possa contribuir também para a maior tolerância relativa do mesmo sob estresse hídrico severo. Entretanto, neste nível de estresse o tolerante apresentou menores níveis de GST 22. Novamente estes dados indicam que diferentes mecanismos

antioxidativos ocorrem temporalmente na resposta ao estresse hídrico, e que somente alguns deles estão correlacionados com a tolerância.

4.1.4 Proteínas diferencialmente expressas entre os cultivares sob estresse severo e associadas a tolerância à seca

Os resultados obtidos permitiram observar que as mudanças no proteoma indicam um claro grupo de mecanismos associados a tolerância. Em primeiro lugar, observamos o grande número de proteínas da respiração que são mais expressas no cultivar tolerante, fornecendo mais evidências para a resposta diferencial da respiração na tolerância. Estas incluíram a aldolase (5 proteínas), GAPDH (3 proteínas), MDH (3 proteínas), TKL (2 proteínas), TPI, SCoAL, enzima málica (EM) e VDAC. De todas estas proteínas somente duas MDH, e a TPI foram induzidas por estresse no tolerante. Esta maior indução no estresse de todas estas foi transitória, e foi reduzida sob estresse severo. Estes resultados indicam que um mecanismo de tolerância não seja o aumento da respiração, mas a menor redução da respiração sob estresse. O fato de que o crescimento radicular diminui gradativamente, mas sempre é maior no genótipo tolerante, suporta esta hipótese.

Uma segunda e clara resposta do proteoma é novamente relacionada com a expressão de enzimas do mecanismo antioxidativo. O genótipo tolerante possui maiores níveis de GST8, Fe-SOD, catalase 1/2 e 4, APX (1) e (2), e LGB (1) e (2). Entretanto não verificamos diferenças no estresse oxidativo em raízes entre os genótipos neste nível de estresse. Uma possível explicação seria que a maior taxa de crescimento das raízes, necessariamente levaria a uma maior produção de radicais livres no tolerante na presença de estresse. Este maior nível de estresse não seria maior graças a maior atividade deste grupo de proteínas. Entretanto, somente a GST8 foi induzida por estresse. A anexina foi a proteína que foi mais diferencialmente presente no cultivar tolerante (aproximadamente 9 vezes) sob estresse severo e, também, não é induzida por seca. Evidências sugerem que as anexinas estejam envolvidas em resposta a estresse oxidativo, agindo como peroxidases. Segundo Gorecka et al. (2005) estas proteínas eliminam H_2O_2 protegendo as células de estresse oxidativo e apoptose atuando como uma enzima antioxidante. A anexina é importante para a integridade da membrana celular e sinalização celular, atuando, especialmente, em condições de estresse osmótico e salino, mantendo a integridade celular (Cantero et al., 2006; Gerke & Moss, 2001). Isto indica que um dos mecanismos de tolerância contra o estresse seria a menor redução do mecanismo antioxidativo sob estresse, incluindo todas as proteínas citadas

neste parágrafo, uma vez que é sabido que altos níveis de estresse reduzem a atividade de várias enzimas antioxidativas (Esfandiari et al., 2007; Abedi & Pakniyat, 2010).

Também no estresse severo, podemos ver atuando alguns dos mecanismos antioxidativos vistos na resposta ao estresse moderado, como a aqui proposta contribuição do metabolismo secundário contra o estresse oxidativo. Esta hipótese é sustentada pela maior expressão das proteínas CHS, CCoAOMT, IFR e CHI, todas enzimas da síntese de flavonoides. Destas, somente a CCoAOMT é uma enzima induzida sob estresse hídrico no genótipo tolerante. Analisando os dados em conjunto, sugere-se que o maior acúmulo de proteínas do metabolismo secundário resulta numa menor redução desse metabolismo no cultivar tolerante sob estresse hídrico severo. Duas evidências adicionais sustentam esta hipótese. Primeiro há menor queda na respiração no tolerante, e como a rota dos flavonóides deriva dos fenilpropanoides, o qual por sua vez depende do ciclo oxidativo das pentoses, uma rota respiratória, é lógico supor que a menor redução na respiração resulte em menor redução no metabolismo secundário sob a seca, ou seja, havendo menor redução também dos mecanismos antioxidativos no tolerante.

Outra resposta do proteoma no cultivar Embrapa 48 é que este possui maior expressão de duas fosfatases ácidas. Sabe-se que a seca reduz drasticamente o teor de fósforo em folhas e raízes (McLachlan, 2004), e aumenta a expressão de fosfatase ácida (Cunhua, 2010) ou sua atividade (Ehsanpour & Amini, 2003). Visto que estas proteínas não foram induzidas pelo estresse hídrico no cultivar tolerante, podemos interpretar que isto significa que haveria uma manutenção de mecanismos de homeostase do fósforo na célula somente no tolerante sob estresse hídrico. Níveis adequados de fósforo são essenciais para haver uma manutenção da respiração, a qual também postulamos existir. Da mesma forma, observou-se que sob estresse hídrico severo ha maior volume radicular neste cultivar, sugerindo que a manutenção, mesmo que parcial desta homeostase possa ter importante contribuição para este fenótipo morfológico, que por sua vez, é uma importante contribuição para o retardamento da desidratação que este cultivar possui.

4.1.5 Fosforilações induzidas por estresse hídrico no cultivar tolerante

A fosforilação é uma das mais importantes modificações pós-traducionais de proteínas, atuando na ativação ou desativação de enzimas (García-Mauriño et al., 2003), fatores de transcrição (Agarwal et al., 2007; Kagaya et al., 2002), proteínas relacionadas a transdução de sinal (Li & Komatsu, 2000; Li et al., 2003), alteração da localização

subcelular de proteínas (Fang et al., 2007), e desempenham papéis em muitos outros processos celulares em plantas (Zuh & Ning, 2013; Monks et al., 2001).

Centenas de proteínas são rotineiramente fosforiladas em uma célula vegetal e algumas proteínas já foram relatadas para serem fosforiladas por estresse hídrico em plantas (Ke et al., 2009; Bentem et al., 2005).

Nesse estudo, 23 proteínas exibiram alterações no padrão de fosforilação em resposta a seca no cultivar tolerante. Algumas dessas proteínas marcadas como fosforiladas ainda não tinham sido descritas como fosforiladas e nem confirmadas como alvos de cinases e fosfatases pela plataforma *Plant Protein Phosphorylation Data Base* (P³DB), como as enzimas Fe-SOD, CHI, VSPB, SAHH e MLP43.

A respiração foi o grupo cuja fosforilação foi fortemente afetada em resposta a seca, sendo representada por 12 proteínas. A análise conjunta somente no genótipo tolerante permitiu ver que o aumento da fosforilação de uma proteína pode ser transiente com o estresse. No caso das enzimas respiratórias, observamos esse aumento transiente na fosforilação da enzima que atua na fosforilação oxidativa, ATPSb, e de duas enzimas glicolíticas, FRK2 e GAPDH, as quais tiveram elevados níveis de fosforilação no déficit moderado. Já a FBPase que também é uma enzima glicolítica, teve maior nível de fosforilação no déficit severo. Esse aumento observado nas condições de déficit nesse cultivar mostra uma indução da fosforilação com a imposição do déficit, podendo indicar maior ativação das rotas envolvidas (fosforilação oxidativa e glicólise). Entretanto, a fosforilação pode inibir a atividade enzimática, como no caso da nitrato redutase, onde a fosforilação torna a proteína susceptível a degradação, ou inibição da atividade (no caso da ATPSb). ATPSb foi confirmada ser fosforilada por uma caseína cinase II (Kanekatsu et al., 1998; Bunney et al., 2001). Uma redução na atividade da ATPSb foi observada em arroz sob estresse térmico e essa redução se deu pela fosforilação, ou seja, quando fosforilada a atividade foi inibida (Lee et al., 2007). Outro fato interessante é que outras duas enzimas glicolíticas, TPI e PGM, mostraram-se fosforiladas apenas sob déficit hídrico na cultivar tolerante, a qual teve menor redução do crescimento radicular, e, portanto, menor redução da demanda de ATP e de intermediários glicolíticos, fortalecendo a hipótese de ativação e aumento da via glicolítica. Essas proteínas já são sabidamente fosforiladas (Tan et al., 2007; Ke et al., 2009; Nanjo et al., 2010) com sítios de fosforilação depositados na plataforma (P³DB), no entanto, ainda não se conhece o papel da fosforilação dessas proteínas. É interessante relacionar esses resultados ao aumento transiente de ABA nas raízes, o qual ocorreu somente no tolerante. É sabido que o acúmulo de ABA é induzido por déficit hídrico e

envolve um grande numero de processos de sinalização que inclui a percepção do estresse, a transdução do sinal, transmissão celular do sinal do estresse e a ativação final de genes que são responsivos para produção de ABA. Furuichi et al. (2005) mostraram que cascatas de cinases envolve sinalização por ABA e, em *Arabidopsis*, fosfatases do tipo PP6 regulam a sinalização por ABA através da desfosforilação e desestabilização de ABI₅ (Migqiu et al., 2013). Outros estudos mostraram também que o acúmulo de ABA induzido por déficit hídrico desempenha um papel chave na comunicação das raízes para parte aérea. Estes fatos sugerem um papel adicional do ABA na resposta ao estresse hídrico, induzindo cascatas cinases e aumentando a respiração para permitir a menor redução crescimento radicular em resposta a seca (Dapeng et al., 2001), fato esse que está de acordo com o maior volume radicular observado no cultivar tolerante.

Já quando foi analisado o nível de fosforilação de enzimas do metabolismo antioxidativo verifica-se que a fosforilação na APX é fortemente induzida pelo déficit moderado e o oposto ocorreu com a Fe-SOD, sendo esta ainda não relatada com alvo de fosforilação na plataforma P³DB. Esse fato pode estar relacionado a diferentes mecanismos de desintoxicação das células observadas nas plantas e a fosforilação dessas enzimas atuaria na ativação ou inibição de uma rota em relação a outra. Já é bem estabelecido que o estresse hídrico faça com que o nível de ROS se eleve, resultando em aumento da expressão e atividade de muitas enzimas antioxidativas em plantas (Esfandiari et al., 2007, Abedi & Pakniyat, 2010). A fosforilação de enzimas antioxidantes em raízes de soja pode resultar em alteração na atividade enzimática em resposta ao estresse hídrico.

Alterações no grau de fosforilação destas proteínas sob estresse hídrico não foram relatadas anteriormente. E, nem todas as proteínas putativas diferencialmente fosforiladas identificadas neste estudo são fosfoproteínas conhecidas. Esse fato reforça a importância da caracterização funcional da fosforilação nessas enzimas responsivas ao déficit hídrico e estudos adicionais são necessários, como a determinação da atividade das enzimas, para entender o papel da fosforilação nessas proteínas alvo em resposta ao déficit hídrico e as cinases envolvidas nesses processos.

4.1.6 Fosforilações induzidas entre os cultivares sob estresse moderado e severo em raízes de soja

Os resultados obtidos permitem relacionar que as respostas do fosfoproteoma possivelmente estejam associadas as mudanças no proteoma diferencial e indicam um claro grupo de mecanismos associados a tolerância induzidos pela fosforilação. Em primeiro lugar, observamos o grande número de enzimas da respiração que são mais

expressas no cultivar tolerante e que também são mais fosforiladas, providenciando mais evidências para a resposta diferencial da respiração na tolerância. Estas incluíram a ATPSb (1 proteína), FRK2 (1 proteína), FBPase (3 proteínas), GAPDH (4 proteínas) e TPI (1 proteína), sendo que duas outras proteínas não foram marcadas como fosforiladas no cultivar sensível (FRK e PGM). Todas estas proteínas tiveram fosforilações induzidas por estresse no tolerante. Considerando ao mesmo tempo, que a maior fosforilação foi acompanhada pela menor redução do crescimento radicular, estes resultados sugerem que a fosforilação possa ser um mecanismo de ativação de proteínas respiratórias e reforça a hipótese da importância do aumento da rota glicolítica para tolerância a seca. A determinação da atividade total destas enzimas pode fornecer uma evidência direta definitiva para suportar esta hipótese.

Uma segunda e clara resposta do fosfoproteoma está relacionada com o aumento na fosforilação de enzimas de biossíntese de aminoácidos (GSbeta1, MetE) e do metabolismo secundário (SAHH, SAMDMT e CHI), indicando que o cultivar tolerante aumenta, por meio da fosforilação, essas duas importantes vias do metabolismo vegetal na presença de déficit moderado.

Analisando o estresse severo, foram identificadas 22 proteínas fosforiladas comuns aos dois genótipos, sendo 14 delas mais expressas no cultivar tolerante, e, portanto, possivelmente associadas ao aumento de vias importantes de tolerância à seca. Destas 14, nove são relacionadas à respiração: GAPDH (3 proteínas), MDH (3 proteínas), TPI e PGM (2 proteínas). Além destas nove, observamos a maior abundância de uma proteína da síntese de aminoácidos (SAMDMT), uma de reserva (VSP) e uma enzima não caracterizada. A MDH já era conhecida por ser fosforiladas sob várias condições de seca e/ou por aplicação de ABA exógeno em diferentes espécies (Bray, 2004). Com exceção da MDH, todas foram responsivas no genótipo tolerante.

5. CONCLUSÕES

A partir da análise do proteoma diferencial de raízes de soja responsivas ao déficit hídrico no genótipo tolerante e proteínas diferenciais nos genótipos sob déficits foi possível obter uma visão da resposta ao déficit hídrico na raiz, por meio da identificação de várias proteínas/enzimas de diferentes rotas metabólicas envolvidas no processo de tolerância a seca em soja.

A análise proteômica foi capaz de produzir resultados de expressão diferencial do sistema estudado, confirmando seu uso como ferramenta importante na biologia de sistemas. Esta ferramenta mostrou que existem diferenças expressivas na abundância de várias proteínas entre os cultivares contrastantes, e que o cultivar tolerante possivelmente apresenta maiores taxas respiratórias tanto na ausência como na presença de diferentes níveis de estresse, e isto foi correlacionado com maiores níveis de expressão de várias enzimas da respiração. O metabolismo antioxidativo também teve destaque nos mecanismos de tolerância tendo o cultivar sensível maior dano oxidativo por apresentar maiores níveis de chaperonas moleculares e catalase, que são induzidas quando existe dano oxidativo, e menores níveis de leghemoglobinas, que reduzem os níveis de radicais livres. Além disso, o cultivar tolerante apresentou maior fluxo metabólico do metabolismo secundário pela maior expressão de enzimas dessas rotas o que suporta a ideia de um mecanismo antioxidativo mais efetivo nas plantas tolerantes. Os dados de crescimento e de perfil metabólico sugerem uma maior indução do crescimento radicular e da respiração no cultivar tolerante, fenômenos propriamente encadeados, e sustentados pelos dados de proteoma na expressão diferencial de enzimas do metabolismo de aminoácidos e respiração.

O fosfoproteoma apresentou uma correlação com o proteoma diferencial na ausência e na presença de déficit severo com muitas proteínas comuns às duas abordagens. A respiração foi o grupo cuja fosforilação foi fortemente afetada em resposta à seca, sendo representada por 12 proteínas. A análise conjunta somente no genótipo tolerante permitiu observar que o aumento da fosforilação de uma proteína pode ser transiente com o estresse e que esse fato pode estar relacionado a modulação de diferentes rotas metabólicas. Adicionalmente, várias enzimas da respiração, síntese de aminoácidos e mecanismo antioxidativo, tiveram aumento em sua fosforilação sem ter alterações em sua abundância, fornecendo evidências complementares para a resposta diferencial da respiração na tolerância a seca em soja.

Os resultados também sugerem um papel adicional do ABA na resposta ao estresse hídrico, induzindo cascatas cinases e aumentando a respiração para permitir a

menor redução crescimento radicular em resposta a seca, o que poderia explicar o maior volume radicular observado no cultivar tolerante sob seca. Estes resultados reforçam a visão de que a tolerancia a seca seja governada por múltiplos genes e mecanismos atuando em sintonia. E sugerem que além da regulação transcricional de genes de enzimas da respiração e mecanismo antioxidativo na tolerancia a seca, a regulação pós traducional (fosforilação), ainda de importancia desconhecida, parece ser também importante nos mecanismos de tolerancia a seca.

Em conclusão, a fosforilação de proteínas constitui um tipo importante de modificação pós traducional mobilizando um grande número de genes. Encontra-se envolvida em muitos processos celulares importantes e amplamente participa nas características do proteoma, ou seja, muitas proteínas no proteoma diferencial foi mais abundante no tolerante e ao mesmo tempo apresentou maior nível de fosforilação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedi T, Pakniyat H. Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 46: 27 -34, 2010.
- Acevedo RM, Maiale SJ, Pessino SC, Bottini R, Ruiz OA, Sansberro PA. A succinate dehydrogenase flavoprotein subunit-like transcript is upregulated in *Ilex paraquariensis* leaves in response to water deficit and abscisic acid. Plant Physiology and Biochemistry. 65: 48-54, 2013.
- Agarwal P, Agarwal PK, Nair S. Stress-inducible DREB2A transcription factor from *Pennisetum glaucum* is a phosphoprotein and its phosphorylation negatively regulates its DNA-binding activity. Molecular Genetic Genomics. 277: 189 – 198, 2007.
- Agrawal GK, Thelen JJ. A High-Resolution Two Dimensional Gel- and Pro-Q DPS-Based Proteomics Workflow for Phosphoprotein Identification and Quantitative Profiling. Marjo de Graauw (ed.), Phospho-Proteomics, Methods and Protocols, v. 527. Humana Press, New York, 2009.
- Alegado RA, Ferriera S, Nusbaum C, Young SK, Zeng Q, Imamovic A, Fairclough SR, King N. Complete Genome Sequence of *Algoriphagus* sp. PR1, Bacterial Prey of a Colony-Forming Choanoflagellate. Journal Bacteriological 193:1485-1486, 2011.
- Alekseeva AA, Savin SS, Tishkov VI. NAD (+) -dependent Formate Dehydrogenase from Plants. Acta Naturae 3: 38 - 54, 2011.
- Annicchiarico, P. Lucerne shoot and root traits associated with adaptation to favorable or drought-stress environments and to contrasting soil types. Field Crops Research 102: 51 - 59, 2007.
- Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences 24: 23 – 58, 2005.
- Becana M, Klucas RV. Oxidation and reduction of leghemoglobin in root nodules of leguminous plants. Plant Physiology 98 (4): 1217-1221, 1992.
- Berger S, Bell E, Sadka A, Mullet JE. *Arabidopsis thaliana* Atvsp is homologous to soybean VspA and VspB, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. Plant Molecular Biology 27: 933 - 942, 1995.
- Bischof K. Oxidative stress and enzymatic scavenging of superoxide radicals induced by solar UV-B radiation in *Ulva* canopies from southern Spain. Science 67: 353 - 359, 2003.
- Böhmer M, Schroeder JI. Quantitative transcriptomic analysis of abscisic acid-induced and reactive oxygen species-dependent expression changes and proteomic profiling in *Arabidopsis* suspension cells. Plant Journal 67: 105-118, 2011.

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248 - 254, 1976.
- Bray, EA. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* 103: 1035 - 1040, 1993.
- Bunney TD, van Walraven HS, de Boer AH. 14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 4249 – 4254, 2001.
- Burris RH, Roberts GP. Biological nitrogen fixation. *Annual Review of Nutrition* 13: 317–335, 1993.
- Chaves, MM, Pereira, JS, Maroco, J, Rodrigues, ML, Ricardo, CP, Osorio ML, Carvalho I, Faria TC. Pinheiro C. How plants cope with water stress in the field. *Annals Botany* 89: 907 – 916, 2002.
- Chen M, Thelen JJ. The plastid isoform of triose phosphate isomerase is required for the postgerminative transition from heterotrophic to autotrophic growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 22: 77 - 90, 2010.
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E. A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant Journal* 52: 167 – 174, 2007.
- Cortina C, Culiáñez-Macià F. Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science* 169: 75 – 82, 2005.
- Cren M, Hirel B. Glutamine synthetase in higher plants. Regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant Cell Physiology* 40: 1187-1193, 1999.
- Cunhua S, Wei1 DW, Xiangling C, Xinna X, Yahong Z, Dong S, Jianjie S. The effects of drought stress on the activity of acid phosphatase and its protective enzymes in pigweed leaves. *African Journal of Biotechnology* 9: 825 - 833, 2010.
- Cutforth HW, McGinn SM, McPhee KE, Miller PR. Adaptation of pulse crops to the changing climate of the Northern Great Plains. *Agronomy Journal* 99: 1684 – 1699, 2007.
- Dai M, Xue Q, Mccray T, Margavage K, Chen F, Lee J-H , Nezames CD, Guo Liquan, Terzaghi W, Wane J, Deng XW, Wanga H. The PP6 Phosphatase Regulates ABI5 Phosphorylation and Absciscic Acid Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* February, 2013.
- Dat J, Vandenbeeke S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegm F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Molecular Life Science* 57: 779 – 795, 2000.
- Davies PJ. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. *Plant Hormones* 1: 1–15, 2010.
- Denecke J, Goldman MHS, Demolder J, Seurinck J, Bottermana J. The Tobacco Luminal Binding Protein is Encoded by a Multigene Family. *The Plant Cell* 3: 1025-1035, 1991.

- Dergisi, GÜFB. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms. *Journal of Science* 4: 723 - 740, 2005.
- Dihanich M, Suda K, Schatz G. A yeast mutant lacking mitochondrial porin is respiratory-deficient, but can recover respiration with simultaneous accumulation of an 86-kd extramitochondrial protein. *EMBO Journal* 6: 723-728, 1987.
- Dixon DP, Laphorn A, Edwards R. Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3: 1 - 10, 2002.
- Doke N. The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress. In: Scandalios JG, ed. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 785–813, 1997.
- Dood IC. Root-to-shoot signalling: assessing the roles of up in the up and down world of long-distance signalling in plants. *Plant and Soil* 274: 251 – 270, 2005.
- Ehsanpour A, Amini F. Effect of salt and drought stress on acid phosphatase activities in alfalfa (*Medicago sativa* L.) explants under in vitro culture. *African Journal of Biotechnology* 2: 133 – 135, 2003.
- Esfandiari EO, Shakiba MR, Mahboob SA, Alyari H, Toorchi M. Water stress, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in wheat seedling, *Journal of Food Agriculture and Environment* 5: 149-153, 2007.
- Fang Y, Sathyanarayanan S, Sehgal A. Post-translational regulation of the *Drosophila circadian* clock requires protein phosphatase 1 (PP1). *Genes & Development* 21: 1506 – 1518, 2007.
- Fehr WR, Caviness CE. Stages on soybean development. Ames: Iowa State University/Cooperative Extension Service, 11p. (Special Report, 80), 1977.
- Ferrer, J.L.; Zubieta, C.; Dixon, R. A.; Noel, J.P. Crystal structures of alfalfa caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. *Plant Physiology* 137: 1009 - 1017, 2005.
- Fiehn O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48: 155–171, 2002.
- Furuichia T, Morib IC, Mutoc S. Protein Kinase Cascade Involved in Rapid ABA-signaling in Guard Cells of *Vicia faba*. *Z. Naturforsch* 60: 769 – 773, 2005.
- Galle A, Florez-Sarasa I, Thameur A, Paepe R, Flexas J, Ribas-Carbo M. Effects of drought stress and subsequent rewatering on photosynthetic and respiratory pathways in *Nicotiana sylvestris* wild type and the mitochondrial complex I-deficient CMSII mutant. *Journal of Experimental Botany* 1: 1-11, 2009.
- Gao JJ, Agrawal GK, Thelen JJ and Xu D. P3DB: a plant protein phosphorylation database. *Nucleic Acids Research* 37: 960, 2009.
- Garavelli JS, Hou Z, Pattabiraman N, Stephens RM. The RESID Database of protein structure modifications and the NRL-3D Sequence-Structure Database. *Nucleic Acids Research* 29: 199 - 201, 2001.

- García-Mauriño S, Monreal JÁ, Álvarez R, Vidal JY, Echevarría, C. Characterization of a salt stress-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in leaves of *Sorghum vulgare*: independence of osmotic stress, involvement of ion toxicity and significance of dark phosphorylation. *Planta* 216: 648 - 655, 2009.
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV, Wu RJ. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 15898 – 15903, 2002.
- Gaudet, D.A., Laroche, A., Frick, M., Davoren, J., Puchalski, B., Ergon, Å. Expression of plant defence-related (PR-protein) transcripts during hardening and dehardening of winter wheat. *Physiological Molecular Plant Pathology* 57: 15 - 24, 2000.
- Giraud E, Ho LHM, Clifton R, The absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiology* 147: 595 – 610, 2008.
- Goodger JQD, Sharp RE, Marsh EL, Schachtman DP. Relationships between xylem sap constituents and leaf conductance of well-watered and water-stressed maize across three xylem sap sampling techniques. *Journal Experimental Botany* 56: 2389 – 2400, 2005.
- Grandori R, Carey J. Six new candidate members of the alpha/beta twisted open-sheet family detected by sequence similarity to flavodoxin. *Protein Science* 3: 185 - 2193, 1994.
- Grandori, R.; Carey, J. Six new candidate members of the alpha/beta twisted open-sheet family detected by sequence similarity to flavodoxin. *Protein Science* 3: 185 - 2193, 1994.
- Guan KL, Xiong Y. Regulation of intermediary metabolism by protein acetylation. *Trends Biochemistry. Science* 36: 108 – 116, 2011.
- Günther C, Schlereth A, Udvardi M, Ott T. Metabolism of reactive oxygen species is attenuated in leghemoglobin-deficient nodules of *Lotus japonicus*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 12: 1596 - 1603, 2007.
- Guzzo SD, Harakava R. Mecanismos envolvidos na resistência induzida em plantas a doenças: sinalização e expressão de genes de defesa. In: Rodrigues FA, Romeiro, RS (Ed.). *Indução de resistência em plantas a patógenos*. Viçosa, MG, cap. 12, p.281- 301, 2007.
- Havelund JF, Thelen JJ, Møller M. Biochemistry, proteomics, and phosphoproteomics of plant mitochondria from non-photosynthetic cells. *Frontiers in Plant Science* 4: 51, 2013.
- Hichri I, Barrieu F, Bogs J, Kappel C, Delrot S, Lauvergeat V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany* doi: 10.1093/jxb/erq442, 2011.

- Hoy JA, Hargrove MS. The structure and function of plant hemoglobins. *Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale* 46: 371-379, 2008.
- Iftekhhar A, Shamima AS, Kyung-Hee K, Jae KY, Myung SC, Byung-Hyun L. Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress. *Plant Soil* 333, 491–505, 2010.
- Ireland RJ, Lea PJ. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism. In: Singh BK (ed) *Plant amino acids. Biochemistry and biotechnology*. Dekker, New York, p. 49-109, 1999.
- Jensen SS, Larsen MR. Evaluation of the impact of some experimental procedures on different phosphopeptide enrichment techniques. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21: 3635–3645, 2007.
- Juszczuk IM, Flexas J, Szal B, Dabrowska Z, Ribas-Carbo M, Rychter AM. Effect of mitochondrial genome rearrangement on respiratory activity, photosynthesis, photorespiration and energy status of MSC16 cucumber (*Cucumis sativus*) mutant. *Physiologia Plantarum* 131: 527 – 541, 2007.
- Kagaya Y, Hobo T, Murata M. Absciscic acid-induced transcription is mediated by phosphorylation of an absciscic acid response element binding factor, TRAB1. *Plant Cell* 14: 3177 – 3189, 2002.
- Kanekatsu M, Saito H, Motohashi K, Hisabori T. The beta subunit of chloroplast ATP synthase (CF0CF1-ATPase) is phosphorylated by casein kinase II. *Biochemistry & Molecular Biology International* 46: 99 – 105, 1998.
- Kang Y, Han Y, Torres-Jerez I, Wang M, Tang Y, Monteros M, Udvardi M. 1) System responses to long-term drought and re-watering of two contrasting alfalfa varieties. *Plant Journal* 68: 871-89, 2011.
- Ke Y, Han G, He H, Li J. Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379: 133 - 138, 2009.
- Khan M, Takasaki H, Komatsu S. Comprehensive phosphoproteome analysis in rice and identification of phosphoproteins responsive to different hormones/stresses. *Journal of Proteomic Research* 4: 1592 – 1599, 2005.
- Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences* 32: 44–50, 2007.
- Knowles JR. Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* 350: 121 - 124, 1991.
- Koc EC, Koc H. Regulation of mammalian mitochondrial translation by post-translational modifications. *Biochimica et Biophysica Acta* 1819: 1055 – 1066, 2012.
- Komatsu S, Kobayashi Y, Nishizawa K, Nanjo Y, Furukawa K. Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress. *Amino Acids* 39 (5) :1435-1449, 2010.

- Kovács I, Ayaydin F, Oberschall A. Immunolocalization of a novel annexin like protein encoded by a stress and abscisic acid responsive gene in alfalfa. *The Plant Journal* 15: 185 - 197, 1998.
- Kunkel BN, Brooks DM. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 325 - 331, 2002.
- Lee AC, Xu X, Blachly-Dyson E, Forte M, Colombini M. The role of yeast VDAC genes on the permeability of the mitochondrial outer membrane. *Journal of Membrane Biology* 161: 173 - 181, 1998.
- Lee J, Feng J, Campbell KB, Scheffler BE, Garrett WM, Thibivilliers S, Stacey G, Naiman DQ, Tucker ML, Pastor-Corrales MA, Cooper B. Quantitative proteomic analysis of bean plants infected by a virulent and avirulent obligate rust fungus. *Molecular & Cellular Proteomics* 8: 19 - 31, 2009.
- Lee SJ, Böhm A, Krug M, Boos W. The ABC of binding-protein-dependent transport in Archaea. *Trends Microbiol.* 15: 389 - 397, 2007.
- Li C, Berninger F, Kostela J, Sonninen E. Drought responses of *Eucalyptus microtheca* provenances depend on seasonality of rainfall in their place of origin. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 231 - 238, 2000.
- Li W, Komatsu S. Cold stress induced calcium-dependent protein kinases in rice (*Oryza sativa* L.) seedling stem tissues. *Theoretical Applications Genetic* 101: 355 – 363, 2000.
- Li Z, Onodera HM, Ugaki M. Characterization of calreticulin as a phosphoprotein interacting with cold-induced protein kinase in rice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 26: 256 – 261, 2003.
- Liener IE. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34 : 31 – 67, 1994.
- Liu Y, Du H, He X, Huang B, Wang Z. Identification of differentially expressed salt-responsive proteins in roots of two perennial grass species contrasting in salinity tolerance. *Journal of Plant Physiology* 169, 117-126, 2012.
- Liu, F.L. et al. Hydraulic and chemical signals in the control of leaf expansion and stomatal conductance in soybean exposed to drought stress. *Functional Plant Biology* 30: 65–73, 2003.
- Ludlow MM, Muchow RCA. Critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. *Advanced Agronomy* 43: 107 – 153, 1990.
- Mahalingam R, Fedoroff N. Stress response, cell death and signalling: The many faces of reactive oxygen species. *Physiology Plantarum* 119: 56 – 68, 2003.
- Manavalan LP, Guttikonda SK, Tran, L-SP. Nguyen, H.T. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant Cell Physiology* 50: 1260–1276, 2009.
- Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology* 21: 255–261, 2003.

- Mason HS, Dewald DB, Creelman RA, Mullet JE. Coregulation of soybean vegetative storage protein gene expression by methyl jasmonate and soluble sugars. *Plant Physiology* 98: 859 - 867, 1992.
- Mason HS, Mullet JE. Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding, and jasmonic acid. *Plant Cell* 2: 569 -579, 1990.
- McLachlan KD. Effects of drought, aging and phosphorus status on leaf acid phosphatase activity in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 35: 777 – 787, 1984.
- Mesquita RO, Soares EA, Barros EG, Loureiro ME. Method optimization for proteomic analysis of soybean leaf: improvements in identification of new and low-abundance proteins. *Genetic Molecular Biology* 35: 353-361, 2012.
- Monks DE, Aghoram K, Courtney PD. Hyperosmotic stress induces the rapid phosphorylation of a soybean phosphatidylinositol transfer protein homolog through activation of the protein kinases SPK1 and SPK2. *Plant Cell* 13: 1205–1219, 2001.
- Monneyeux P, Belhassen E. The diversity of drought adaptation in the wide. *Plant Growth Regulation* 20: 85-92, 1996.
- Moreau S, Meyer JM, Puppo A. Uptake of iron by symbiosomes and bacteroids from soybean nodules. *FEBS Letters* 361: 225–228, 1995.
- Morgan JM. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 35: 299 - 319, 1984.
- Morgan PW, He C, de Greef JA, de Proft MP. Does water deficit stress promote ethylene synthesis by intact plants? *Plant Physiology* 94: 1616-1624, 1990.
- Nakagami H, Sugiyama N, Mochida K, Daudi A, Yoshida Y, Toyoda T. Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. *Plant Physiology* 153: 1161 – 1174, 2010.
- Nanjo Y., Skultety L., Ashraf Y., Komatsu S. Comparative proteome analysis of early-stage soybean seedlings responses to flooding by using gel and gel-free techniques. *Journal Proteome Research* 9: 3989 – 4002, 2010.
- Neuhoff V, Stamm R, Eibl H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic Analysis. *Electrophoresis* 6: 427 - 448, 1985.
- Neumann, PM. Evidence for long-distance xylem transport of signal peptide activity from tomato roots. *Journal Experimental Botany* 58: 2217 – 2223, 2007.
- Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Driscoll S, Novitskaya, L, Foyer, CH. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? *Annual Botany* 89: 841 – 850, 2002.

- Norouzi M, Toorchi M, Salekdeh GH, Mohammadi, SA, Neyshabouri MR, Aharizad S. Effect of water deficit on growth, grain yield and osmotic adjustment in rapeseed, *Journal of Food Agriculture and Environment* 6: 312 - 318, 2008.
- Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Graham J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR. Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *The Plant Journal* 50: 1093 – 1106, 2007.
- Ososki AL, Kennelly EJ. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytotherapy Research* 17 : 84 – 869, 2003.
- Overmyer K, Brosche M, Kangasjärvi J. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in Plant Science* 8: 335 - 342, 2003.
- Padilha FM, Pugnaire FI. Rooting depth and soil moisture control Mediterranean woody seedling survival during drought. *Functional Ecology* 21: 489 - 495, 2007.
- Paradela A, Albar JP. Advances in the Analysis of Protein Phosphorylation. *Journal of Proteome Research* 7: 1809 – 1818, 2008.
- Patridge EV, Ferry JG. WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Journal of Bacteriology* 188: 3498 - 3506, 2006.
- Phytozome. Disponível em: <<http://www.phytozome.com/>>. Acesso em: 08 Out. 2012.
- Pimentel D, Patzek T. Ethanol production using corn, switchgrass and wood; biodiesel production using soybean . In *Biofuels, Solar and Wind as Renewable Energy Systems* . Edited by Pimentel , D. pp. 373 – 394. Springer, New York, 2008.
- Polle A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway by metabolic modeling: computer analysis as a step towards flux analysis. *Plant Physiology* 126: 445 - 462, 2001.
- Raghavendra AS, Padmasree K. Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends in Plant Science* 8: 546 – 553, 2003.
- Rampitsch C, Bykova NV. The beginnings of crop phosphoproteomics: exploring early warning systems of stress. *Frontiers in Plant Science* 3: 1-5 article 144, 2012.
- Rao RS, Møller IM. Large-scale analysis of phosphorylation site occupancy in eukaryotic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1824: 405 – 412, 2012.
- Rasmusson AG, Geisler DA, Møller IM. The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion* 8: 47 – 60, 2008.
- Ribas-Carbo M, Taylor NL, Giles L, Busquets S, Finnegan PM, Day DA, Lambers H, Medrano H, Berry JA, Flexas J. Effects of water stress on respiration in soybean leaves. *Plant Physiology* 139: 466 – 473, 2005.

- Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E. Cytokinin-independent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit. *Plant Physiology* 150: 1530 – 1540, 2009.
- Roberts MR, de Bruxelles GL. Plant 14-3-3 protein families: evidence for isoform-specific functions? *Biochemical Society Transactions* 30 (4): 373-8, 2002.
- Rontein D, Basset G, Hanson AD. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metabolic Engineer* 4: 49 - 56, 2002.
- Rosen R, Becher D, Buttner K, Biran D, Hecker M, Ron EZ. Highly phosphorylated bacterial proteins. *Proteomics* 4: 3068 – 3077, 2004.
- Saibo NJM, Lourenço T, Oliveira MM. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of Botany* 103: 609–623, 2009.
- Sakai T, Kogiso M. Soyisoflavones and immunity. *Journal Medical Investment* 55: 167 – 173, 2008.
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* 2: 1131 – 1145, 2002.
- Schachtman DP, Goodger JQD. Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science* 13: 281 - 287, 2008.
- Schulenberg B, Patton WF. Combining microscale solution-phase isoelectric focusing with Multiplexed Proteomics dye staining to analyze protein post-translational modifications. *Electrophoresis* 25: 2539 – 2544, 2004.
- Setsuko K, Nagib A. Soybean proteomics and its application to functional analysis. *Journal of Proteomics* 72: 325 – 336, 2009.
- Sharma KK, Lavanya M. Recent developments in transgenic for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics. In *JIRCAS Working Report* pp. 61 – 73, 2002.
- Sharma S, Sharma SS, Rai VK. Modulation by phenolic compounds of ABA-induced inhibition of mustard (*Brassica juncea* L. cv. RLM 198) seed germination. *Indian J Experimental Biology* 4: 352 - 356, 2003.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature* 1: 2856 - 2860, 2006.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 221 - 227, 2007.
- Siegel D, Gustafson DL, Dehn DL, Han JY, Boonchoong P, Berliner LJ, Ross D. NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1: Role as a Superoxide Scavenger. *Molecular Pharmacological* 65: 123 –1247, 2004.
- Silva VP. Caracterização fisiológica da tolerância a seca em *Coffea canefora*: contribuição relativa do sistema radicular e parte aérea. Viçosa, UFV, 2007, 57pp (Tese de doutorado).

- Smirnoff N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessication. *New Phytologist* 125: 27 - 28, 1993.
- Soares CQG. Proteomica diferencial e caracterização fisiológica de dois clones de *Coffea canefora* sob déficit hídrico. Viçosa, UFV, 2008, 98pp (Dissertação de mestrado).
- Songsri P, Jogloy S, Vorasoot N, Akkasaeng C, Patanothai A, Holbrook CC. Root distribution of drought-resistant peanut genotypes in response to drought. *Journal Agronomy & Croop Sciense* 194: 92 - 103, 2008.
- Soranzo N, Sari-Gorla M, Mizzi L, Toma G, Frova C. Organization and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Molecular Genetics and Genomics* 271, 511 - 521, 2001.
- Sreenivasulu N, Harshavardhan VT, Govind G, Seiler C, Kohli, A. Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? *Gene* 506: 265 – 273, 2012.
- Staswick PE. Storage proteins of vegetative plant tissues. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 303 - 322, 1994.
- Studart-Guimarães C, Fait A, Nunes-Nesi A, Carrari F, Usadel B, Fernie AR. Reduced expression of succinyl-coenzyme A ligase can be compensated for by up-regulation of the gamma-aminobutyrate shunt in illuminated tomato leaves. *Plant Physiology* 145: 626 - 639, 2007.
- Studart-Guimarães S, Gibon Y, Frankel N, Wood CC, Zanol MI, Fernie AR, Carrari F. Identification and characterisation of the a and b-subunits of succinyl CoA of tomato. *Plant Molecular Biology* 59: 781 – 791, 2005.
- Suzuki K, Itai R, Suzuki K, Nakanishi H, Nishizawa N-K, Yoshimura E, Mori S. Formate Dehydrogenase, an Enzyme of Anaerobic Metabolism, Is Induced by Iron Deficiency in Barley Roots, *Plant Physiology* 116: (2) 725-732, 1998.
- Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 276: 26405 - 26410, 2001.
- Thiel J, Rolletschek H., Friedel S, Lunn JE, Nguyen TH, Feil R, Tschiersch H, Müller M, Borisjuk L. Seed-specific elevation of non-symbiotic hemoglobin AtHb1: beneficial effects and underlying molecular networks in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 11: 48, 2011.
- Thompson, A.J. Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. *Plant Cell Environmental* 30: 67 – 78, 2007.
- Umezawa T, Fujita M, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 113 - 122, 2006.
- Wang KLC, Li H, Ecker JR. Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *Plant Cell* 14: S131 - S151, 2002.

- Wang W, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1 - 14, 2003.
- Waseem M, Ali A, Tahir M, Nadeem MA, Ayub M, Tanveer A, Ahmad R, Hussain M. Mechanism of drought tolerance in plant and its management through different methods. *Continental Journal Agricultural Science* 5: 10 - 25, 2011.
- Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126:485-493, 2001.
- Wittenbach VA. Purification and characterization of a soybean leaf storage glycoprotein. *Plant Physiology* 73, 125 - 129, 1983.
- Xiong I, Schumaker KS, Zhu J-K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 14: 165-183, 2002.
- Xiong L, Yang Y. Disease Resistance and Abiotic Stress Tolerance in Rice Are Inversely Modulated by an Abscissic Acid-Inducible Mitogen-Activated Protein Kinase. *Plant Cell* 15: 745 – 759, 2003.
- Yang SF, Hoffman NE. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 155 - 189, 1984.
- Yao Q, Bollinger C, Gao J, Xu D, Thelen JJ. P3DB: an integrated database for plant protein phosphorylation. *Frontier Plant Science* 3: 206, 2012.
- Yu KW, Gao WY, Hahn EJ, Paek KY. Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Biochemistry Engineer. J.* 11: 211 - 215, 2002.
- Zabala, G, Zou J, Tuteja J, Gonzalez DO, Clough SJ, Vodkin LO. Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of *Glycine max* in response to *Pseudomonas syringae* infection. *BMC Plant Biology* 6: 26, 2006.
- Zeid IM, Shedeed ZA. Response of alfalfa to putrescine treatment under drought stress. *Biologia Plantarum* 50: 4, 635-640, 2006.
- Zhang D, He F, Jia W. Cell biological mechanism for triggering of ABA accumulation under water stress in *Vicia faba* leaves. *Science in China* 44:4, 421-428, 2001.
- Zhu L, Li N. Quantitation, networking, and function of protein phosphorylation in plant cell. *Frontiers in Plant Science* 3: 302, 2012.

7. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1. Nível de expressão relativa das proteínas diferencialmente expressas ($P < 0,05$) baseada na média da % de volume em raízes de plantas contrastantes de soja na ausência de déficit hídrico (controle), com sua identificação das proteínas por MS.

Spot ID		Proteína	Média da % de volume ± DP		SCORE	Número Peptídeos	Cobertura (%)	Nível de expressão
			(Controle irrigado)					
			Tolerante	Sensível				
RESPIRAÇÃO								
282	ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like	0,7020 ± 0,0702	1,0496 ± 0,1157	721	8	22	-1,50	
419	Alcohol dehydrogenase 1-like	0,1022 ± 0,0050	0,1633 ± 0,0099	315	2	19	-1,60	
197	Malate dehydrogenase, mitochondrial-like	0,0312 ± 0,0021	0,0482 ± 0,0099	275	2	18	-1,54	
202	Phosphoglycerate kinase, cytosolic-like	0,9049 ± 0,0265	0,5003 ± 0,0061	1043	9	33	+1,81	
393	Transaldolase-like	0,0143 ± 0,0040	0,0251 ± 0,0050	208	3	11	-1,76	
330	Transketolase, chloroplastic-like	0,0765 ± 0,0035	0,0509 ± 0,0061	289	3	15	+1,50	
METABOLISMO DE NITROGENIO								
388	Cytosolic glutamine synthetase GSbeta1	0,5154 ± 0,0093	0,8578 ± 0,0225	424	3	16	-1,66	
389	Cytosolic glutamine synthetase GSbeta1	0,7891 ± 0,0083	1,2501 ± 0,0245	496	5	23	-1,58	
212	Formate dehydrogenase 1, mitochondrial-like	0,9088 ± 0,2647	0,5234 ± 0,0610	496	5	19	+1,74	
213	Formate dehydrogenase 1, mitochondrial-like	1,0098 ± 0,0462	0,1012 ± 0,0054	598	6	25	+9,98	
METABOLISMO ANTIOXIDATIVO								
3	Chain A, Ferric Soybean Leghemoglobin Complexed With Nicotinate	0,3120 ± 0,0258	0,0930 ± 0,0044	604	5	12	+3,35	
5	Chain A, Ferric Soybean Leghemoglobin Complexed With Nicotinate	1,8031 ± 0,2645	0,3434 ± 0,0268	420	5	13	+5,25	
326	Heat shock cognate 70 kDa protein-like	0,1048 ± 0,0060	0,3921 ± 0,0061	326	2	14	-3,74	
0	Leghemoglobin C3	3,6216 ± 0,2453	1,9110 ± 0,1265	743	6	13	+1,9	
1	Leghemoglobin C3	1,8226 ± 0,2015	0,6145 ± 0,1210	375	4	13	+2,97	
324	Luminal-binding protein 4-like	0,1085 ± 0,0013	0,3807 ± 0,0026	464	4	19	-3,51	
358	Nucleoside diphosphate kinase	1,4622 ± 0,0943	0,2976 ± 0,0461	305	4	17	+4,91	
400	Peroxisomal betaine-aldehyde dehydrogenase	0,2562 ± 0,0315	0,1707 ± 0,0352	188	2	15	+1,50	
METABOLISMO SECUNDÁRIO								
220	12-oxophytodienoate reductase 2-like	0,0712 ± 0,0053	0,0369 ± 0,0039	486	5	23	+1,93	

59	Chalcone isomerase A	0,3311 ± 0,2084	0,2083 ± 0,0639	985	11	62	+1,59
161	Isoflavone reductase homolog	1,0013 ± 0,0826	0,6529 ± 0,0576	612	6	23	+1,53
144	NAD(P)H-dependent 6'-deoxychalcone synthase	0,1064 ± 0,0200	0,0642 ± 0,0343	761	8	18	+1,66
359	Stress-induced protein SAM22	1,9451 ± 0,0995	0,3215 ± 0,0274	490	6	55	+6,05
NÃO CONHECIDO							
150	Uncharacterized protein LOC100499848	0,0516 ± 0,0053	0,0862 ± 0,0081	389	4	35	-1,67
20	Uncharacterized protein LOC100527699	0,0327 ± 0,0032	0,0511 ± 0,0027	458	3	31	-1,56
RESERVA							
90	Stem 31 kDa glycoprotein precursor	0,4883 ± 0,0265	0,3034 ± 0,0610	630	6	15	+1,61
91	Stem 31 kDa glycoprotein precursor	1,0298 ± 0,0462	0,5030 ± 0,0054	788	6	14	+2,05
DEFESA							
24	Pathogenesis-related protein PR-1	1,9540 ± 0,1641	0,1093 ± 0,0064	420	4	64	+17,87
REGULAÇÃO							
214	Actin-101-like	0,1041 ± 0,0013	0,2176 ± 0,0026	576	4	15	-2,09
216	Actin-101-like	0,0552 ± 0,0060	0,1093 ± 0,0061	248	3	12	-1,98
264	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, partial	0,2039 ± 0,0031	0,3677 ± 0,0279	370	2	17	-1,80
33	Trypsin inhibitor p20 precursor	0,0842 ± 0,0017	0,0543 ± 0,0061	520	5	40	+1,55

Os sinais (+) e (-) indicam aumento e diminuição na expressão da proteína em comparação com os genótipos, tendo como referencia o cultivar tolerante (Embrapa 48). DP = desvio padrão. Os valores representam as médias da percentagem em volume (abundancia relativa) ± o desvio padrão de três réplicas biológicas.

Tabela 2. Nível de expressão relativa das proteínas diferencialmente expressas (P<0,05) baseada na média da % de volume em raízes de plantas contrastantes de soja na presença de déficit hídrico moderado (-1,0 MPa), com sua identificação das proteínas por MS.

Spot ID		Proteína	Média da % de volume ± DP		SCORE	Número Peptídeos	Cobertura (%)	Nível de expressão
			(Déficit moderado)					
			Tolerante	Sensível				
METABOLISMO ANTIOXIDATIVO								
53	Glutathione S-transferase GST 22	0,0315 ± 0,0053	0,0485 ± 0,0092	556	6	37	-1,54	
30	Glutathione S-transferase GST 8	0,7341 ± 0,0265	0,4850 ± 0,0610	389	4	17	+1,51	
METABOLISMO DO NITROGENIO								
76	Cytosolic glutamine synthetase GSbeta1	1,2950 ± 0,0462	0,8472 ± 0,0540	424	7	27	+1,53	
RESPIRAÇÃO								

38	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like	1,0980 ± 0,1258	0,7331 ± 0,0436	820	6	25	+1,50
28	Peroxisomal voltage-dependent anion-selective channel protein	0,8570 ± 0,1085	0,3910 ± 0,0365	1014	8	49	+2,19
METABOLISMO SECUNDÁRIO							
55	Flavoprotein wrbA-like	0,4126 ± 0,0315	0,2208 ± 0,0435	753	7	51	+1,87
101	NAD(P)H-dependent 6'-deoxychalcone synthase-like	0,0649 ± 0,0035	0,0421 ± 0,0061	675	6	30	+1,54
110	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	0,2891 ± 0,0830	0,5001 ± 0,0452	175	4	35	-1,73
FUNÇÃO NÃO CONHECIDA							
152	Uncharacterized protein LOC100784424	0,5891 ± 0,0383	0,9501 ± 0,0345	529	5	18	-1,61
SINALIZAÇÃO							
61	14-3-3 protein SGF14h	0,0522 ± 0,0101	0,0833 ± 0,0099	685	6	35	-1,60

Tabela 3. Nível de expressão relativa das proteínas diferencialmente expressas (P<0,05) baseada na média da % de volume em raízes de plantas contrastantes de soja na presença de déficit hídrico severo (-1,5 MPa), com sua identificação das proteínas por MS.

Spot ID		Proteína	Média da % de volume ± DP		SCORE	Número Peptídeos	Cobertura (%)	Nível de expressão
			(Déficit severo)					
			Tolerante	Sensível				
METABOLISMO ANTIOXIDATIVO								
35	Ascorbate peroxidase 1, cytosolic	1,8079 ± 0,0258	1,0331 ± 0,0436	563	4	32	+1,75	
36	Ascorbate peroxidase 1, cytosolic	0,9029 ± 0,0049	0,3606 ± 0,0033	431	4	28	+2,50	
45	Catalase-1/2	0,1034 ± 0,0092	0,0672 ± 0,0035	985	6	12	+1,54	
46	Catalase-4	0,1104 ± 0,0016	0,0626 ± 0,0064	1013	9	18	+1,76	
300	Chain X, Ascorbate Peroxidase R172a Mutant	0,3565 ± 0,0222	0,5342 ± 0,1839	790	6	41	-1,50	
22	Iron-superoxide dismutase	0,0435 ± 0,0035	0,0283 ± 0,0061	470	5	20	+1,54	
37	Glutathione S-transferase GST 8	0,8578 ± 0,0850	0,5154 ± 0,0929	348	4	10	+1,66	
200	Peroxisomal betaine-aldehyde dehydrogenase	0,0134 ± 0,0008	0,0214 ± 0,0026	1173	12	32	-1,61	
25	Leghemoglobin C3	0,0633 ± 0,0099	0,0322 ± 0,0053	584	5	14	+1,97	
26	Leghemoglobin C3	0,0525 ± 0,0050	0,0314 ± 0,0040	435	3	11	+1,67	
RESPIRAÇÃO								
13	Aldolase superfamily protein	0,1110 ± 0,0073	0,0214 ± 0,0049	130	6	25	+5,19	
14	Aldolase superfamily protein	0,1005 ± 0,0092	0,0366 ± 0,0053	83	6	25	+2,74	
15	Aldolase superfamily protein	0,1033 ± 0,0016	0,0358 ± 0,0643	144	8	30	+2,89	

16	Aldolase superfamily protein	0,0966 ± 0,0073	0,0133 ± 0,0532	104	4	20	+7,28
17	Aldolase superfamily protein	0,0984 ± 0,0092	0,0214 ± 0,0015	163	7	28	+4,61
380	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0,9501 ± 0,0452	0,5891 ± 0,0483	820	6	25	+1,61
219	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like	1,0056 ± 0,1597	0,5326 ± 0,0070	1020	8	35	+1,89
220	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like	0,9029 ± 0,0049	0,3606 ± 0,0329	585	5	20	+2,50
11	Malate dehydrogenase, cytoplasmic-like	0,0852 ± 0,0046	0,0534 ± 0,0054	979	6	26	+1,60
12	Malate dehydrogenase, cytoplasmic-like	0,0948 ± 0,0095	0,0611 ± 0,0055	751	7	37	+1,55
10	Malate dehydrogenase, mitochondrial-like	0,0832 ± 0,0021	0,0421 ± 0,0040	708	7	41	+1,98
203	NADP-dependent malic enzyme-like	0,0286 ± 0,0022	0,0184 ± 0,0013	542	6	14	+1,56
280	Peroxisomal voltage-dependent anion-selective channel protein	0,1914 ± 0,0153	0,0427 ± 0,0056	1014	8	49	+4,48
9	Phosphoglycerate kinase, cytosolic-like	0,1080 ± 0,0021	0,0644 ± 0,0031	1356	12	38	+1,68
8	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	0,0214 ± 0,0017	0,0096 ± 0,0006	384	5	19	+2,22
100	Transketolase, chloroplastic-like	0,0356 ± 0,0022	0,0214 ± 0,0013	475	5	19	+1,67
34	Transketolase, chloroplastic-like	1,2760 ± 0,1157	0,7820 ± 0,0743	104	3	12	+1,63
33	Triosephosphate isomerase	1,3890 ± 0,1157	0,8901 ± 0,0602	953	10	17	+1,56
METABOLISMO DE NITROGENIO							
44	Serine hydroxymethyltransferase 2	0,1304 ± 0,0073	0,0527 ± 0,0053	800	8	16	+2,48
METABOLISMO DO FOSFORO							
41	Acid phosphatase precursor	0,0320 ± 0,0036	0,0201 ± 0,0044	690	6	13	+1,59
42	Acid phosphatase precursor	0,0322 ± 0,0021	0,0211 ± 0,0064	485	4	14	+1,53
METABOLISMO SECUNDÁRIO							
124	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase-like	1,0189 ± 0,1157	0,6290 ± 0,0702	1056	8	48	+1,62
59	Chalcone isomerase A	0,3311 ± 0,2084	0,2083 ± 0,0639	985	11	62	+1,59
390	Flavoprotein wrbA-like	0,2891 ± 0,0383	0,5001 ± 0,0245	601	4	34	-1,73
161	Isoflavone reductase homolog	1,0013 ± 0,0826	0,6529 ± 0,0576	612	6	23	+1,53
144	NAD(P)H-dependent 6'-deoxychalcone synthase	0,1064 ± 0,0200	0,0642 ± 0,0343	761	8	18	+1,66
RESERVA							
32	Stem 31 kDa glycoprotein precursor	1,6800 ± 0,1157	0,7326 ± 0,0702	661	10	19	+2,29
SINALIZAÇÃO E REGULAÇÃO							
40	14-3-3 protein SGF14h	0,3606 ± 0,0111	0,1379 ± 0,0126	582	5	31	+2,61
218	Annexin-like protein RJ4-like	0,902 ± 0,0016	0,1011 ± 0,0643	554	6	22	+8,92

43	Putative beta5 proteasome subunit	0,0524 ± 0,0046	0,0341 ± 0,0050	348	3	15	+1,54
----	-----------------------------------	-----------------	-----------------	-----	---	----	-------

Tabela 4. Nível de expressão relativa das proteínas de raízes baseada na média da % de volume de plantas de soja responsivas ao déficit hídrico no genótipo tolerante.

Spot ID	Proteína	Deficit (MPa)	Média da % de volume ± DP				Nível de expressão
			Irrigado		Déficit		
RESPIRAÇÃO							
71	ATP synthase alpha/beta family protein	-1,0	0,3606 ± 0,0111	0,7379 ± 0,0126			-2,05
11	Malate dehydrogenase, cytoplasmic-like	-1,0	0,1285 ± 0,0095	0,4341 ± 0,0054			-3,38
12	Malate dehydrogenase, cytoplasmic-like	-1,0	0,1295 ± 0,0091	0,4611 ± 0,0046			-3,56
28	Peroxisomal voltage-dependent anion-selective channel protein	-1,0	0,1781 ± 0,0137	0,8570 ± 0,0109			-4,33
33	Triosephosphate isomerase	-1,0	0,4901 ± 0,0602	1,2890 ± 0,1157			-2,63
123	Enolase	-1,5	0,1834 ± 0,0383	0,8112 ± 0,0245			-4,42
38	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like	-1,5	1,2980 ± 0,2584	0,8331 ± 0,0436			+1,56
220	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic-like	-1,5	0,8029 ± 0,0049	0,2896 ± 0,0329			+2,77
95	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 1-like	-1,5	0,0843 ± 0,0046	0,4612 ± 0,0046			-5,47
28	Peroxisomal voltage-dependent anion-selective channel protein	-1,5	0,0857 ± 0,0085	0,2910 ± 0,0037			-3,40
METABOLISMO ANTIOXIDATIVO							
5	Chain A, Ferric Soybean Leghemoglobin Complexed With Nicotinate	-1,0	1,8031 ± 0,2645	0,4693 ± 0,0268			+3,84
27	Glutathione S-transferase GST 8	-1,0	0,1532 ± 0,0114	0,6173 ± 0,0633			-4,03
326	Heat shock cognate 70 kDa protein-like	-1,0	0,1048 ± 0,0060	0,1921 ± 0,0061			-1,83
0	Leghemoglobin C3	-1,0	3,6216 ± 0,2453	1,6310 ± 0,1732			+2,22
1	Leghemoglobin C3	-1,0	1,8226 ± 0,2015	0,5725 ± 0,0821			+3,18
324	Luminal-binding protein 4-like	-1,0	0,1085 ± 0,0013	0,1807 ± 0,0026			-1,67
400	Peroxisomal betaine-aldehyde dehydrogenase	-1,0	0,2562 ± 0,0315	0,4573 ± 0,0352			-1,79
45	Catalase-1/2	-1,5	0,0543 ± 0,0092	0,1319 ± 0,0015			-2,43
46	Catalase-4	-1,5	0,0413 ± 0,0016	0,1235 ± 0,0064			-2,99
326	Heat shock cognate 70 kDa protein-like	-1,5	0,1048 ± 0,0060	0,2182 ± 0,0061			-2,08
324	Luminal-binding protein 4-like	-1,5	0,1085 ± 0,0013	0,2807 ± 0,0026			-2,59
358	Nucleoside diphosphate kinase	-1,5	1,4622 ± 0,0943	0,8976 ± 0,0461			+1,63
METABOLISMO DE NITROGENIO							
96	Cobalamin-independent synthase family protein	-1,0	0,2808 ± 0,0452	0,5891 ± 0,0483			-2,10

97	Cobalamin-independent synthase family protein	-1,0	0,2091 ± 0,0383	0,5001 ± 0,0245	-2,39
93	Cytosol aminopeptidase family protein	-1,0	0,2320 ± 0,0036	0,6201 ± 0,0064	-2,67
389	Cytosolic glutamine synthetase GSbeta1	-1,0	0,7891 ± 0,0297	1,5501 ± 0,0725	-1,96
213	Formate dehydrogenase 1, mitochondrial-like	-1,0	0,1781 ± 0,0527	0,2412 ± 0,0114	+4,19
44	Serine hydroxymethyltransferase 2	-1,5	0,0543 ± 0,0073	0,1527 ± 0,0053	-2,81
METABOLISMO SECUNDÁRIO					
124	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase-like	-1,0	0,6290 ± 0,0702	0,9537 ± 0,0812	-1,52
65	Dihydroflavonol-4-reductase-like	-1,0	0,1865 ± 0,0084	0,5162 ± 0,0242	-2,77
55	Flavoprotein wrbA-like	-1,5	0,1262 ± 0,0031	0,0773 ± 0,0035	+1,63
REGULAÇÃO					
34	Adenosylhomocysteinase	-1,5	0,1420 ± 0,0452	0,6210 ± 0,0483	-4,37
RESERVA					
90	Stem 31 kDa glycoprotein precursor	-1,0	0,4883 ± 0,0265	0,3165 ± 0,0701	+1,54
91	Stem 31 kDa glycoprotein precursor	-1,0	1,0298 ± 0,0462	0,5624 ± 0,0254	+1,83

Os sinais (+) e (-) indicam aumento e diminuição na expressão da proteína em comparação com os déficits, tendo como referencia o controle irrigado do cultivar tolerante (Embrapa 48). DP = desvio padrão. -1,0MPa (déficit moderado), -1,5MPa (déficit severo).

Tabela 5. Nível de expressão das fosfoproteínas baseada na média da % de volume das raízes de plantas de soja nos diferentes regimes hídricos dos genótipos contrastantes, tendo como referencia o genótipo tolerante.

Fosfoproteína	Spot ID	Tratamento	SCORE	Número Peptídeos	Cobertura (%)	Média da % de volume ± DP				Tipo de regulação		
						Tolerante		Sensível				
DEFESA												
stress-induced protein SAM22	5	Irrigado	755	8	70	0,0519	±	0,0012	ND	+		
ESTRUTURAL												
Actin-79	49	Irrigado	307	8	27	ND		0,1025	±	0,0105	-	
FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO												
Chain A, Ferric Soybean Leghemoglobin Complexed With Nicotinate	4	Irrigado	358	4	15	0,0632	±	0,0083	ND		+	
Chain A, Ferric Soybean Leghemoglobin Complexed With Nicotinate	3	Irrigado	3198	7	18	0,0595	±	0,0164	0,0109	±	0,0064	+
leghemoglobin C1-like	1	Irrigado	789	4	15	0,0751	±	0,0007	0,0217	±	0,0034	+
Leghemoglobin C2	2	Irrigado	708	4	16	0,0712	±	0,0053	0,0369	±	0,0058	+
METABOLISMO ANAERÓBICO												

formate dehydrogenase 1, mitochondrial-like	19	Irrigado	622	14	41	0,2030	±	0,0462	ND	+
alcohol dehydrogenase 1	89	Severo	166	7	22	0,1097	±	0,0087	ND	+
Lactate/malate dehydrogenase family protein	88	Severo	311	7	18	0,1033	±	0,0072	ND	+
METABOLISMO ANTIOXIDATIVO										
ascorbate peroxidase 2	10	Irrigado	348	10	38	0,0452	±	0,0093	0,0419	± 0,0023 =
ascorbate peroxidase 2	12	Irrigado	247	5	17	0,0362	±	0,0025	0,0317	± 0,0047 =
iron-superoxide dismutase	14	Irrigado	307	8	41	1,1038	±	0,1216	1,1343	± 0,0268 =
NmrA-like negative transcriptional regulator family protein	118	Irrigado	130	6	20	0,0143	±	0,0040	ND	+
ascorbate peroxidase 1, cytosolic	125	Moderado	277	7	35	0,8052	±	0,1005	0,5833	± 0,0099 +
iron-superoxide dismutase	59	Moderado	350	6	32	0,8130	±	0,0846	0,5472	± 0,1054 +
glutathione S-transferase PHI 9	78	Severo	124	7	33	0,0829	±	0,0383	ND	+
NmrA-like negative transcriptional regulator family protein	82	Severo	207	6	25	0,2083	±	0,0021	ND	+
NmrA-like negative transcriptional regulator family protein	83	Severo	229	11	45	0,0852	±	0,0046	0,0834	± 0,0054 =
METABOLISMO PRIMÁRIO										
adenosylhomocysteine	34	Irrigado	430	10	26		ND		0,0273	± 0,0121 -
ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like	50	Irrigado	1134	15	40	0,0184	±	0,0021	0,0292	± 0,0088 -
cytosolic glutamine synthetase GSbeta1	33	Irrigado	472	11	39	0,0143	±	0,0040	0,0325	± 0,0052 -
enolase	51	Irrigado	364	9	28		ND		0,0235	± 0,0071 -
fructokinase-2-like	47	Irrigado	748	13	56	0,0102	±	0,0059	0,0251	± 0,0073 -
fructose-bisphosphate aldolase	24	Irrigado	479	13	39	0,0291	±	0,0026	0,0252	± 0,0061 =
fructose-bisphosphate aldolase, class I	25	Irrigado	456	10	28	0,0191	±	0,0046	0,0181	± 0,0054 =
fructose-bisphosphate aldolase, cytoplasmic isozyme-like	26	Irrigado	637	15	41	0,0246	±	0,0094	0,0240	± 0,0046 =
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	13	Irrigado	331	9	31	0,0217	±	0,0030	0,0161	± 0,0021 =
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like	27	Irrigado	735	7	23	0,0252	±	0,0053	0,0269	± 0,0081 =
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like	21	Irrigado	542	12	43	0,0820	±	0,0031	0,0537	± 0,0028 +
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like	20	Irrigado	555	9	32	0,2488	±	0,0265	0,1030	± 0,0610 +
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like	23	Irrigado	659	9	33	0,1033	±	0,0063	0,1051	± 0,0027 =
malate dehydrogenase 1, mitochondrial	17	Irrigado	829	9	42	0,2702	±	0,0702	0,0962	± 0,0116 +
nucleoside diphosphate kinase 1	6	Irrigado	361	6	22	0,0318	±	0,0050	0,0163	± 0,0059 +
ripening related protein	32	Irrigado	336	5	18		ND		0,0239	± 0,0061 -
triosephosphate isomerase	35	Irrigado	834	11	41		ND		0,0125	± 0,0050 -
ATP synthase alpha/beta family protein	71	Moderado	1284	20	49	0,1504	±	0,0042	0,0705	± 0,0194 +
cytosolic glutamine synthetase GSbeta1	68	Moderado	443	7	22	0,3168	±	0,0094	0,1063	± 0,0233 +
fructokinase-2-like	69	Moderado	811	13	56	0,1243	±	0,0048	ND	+

fructokinase-2-like	70	Moderado	183	6	27	0,1108	±	0,0031	0,0468	±	0,0021	+
fructose-bisphosphate aldolase	64	Moderado	316	5	16	0,0359	±	0,0383	0,0095	±	0,0035	+
fructose-bisphosphate aldolase	67	Moderado	416	8	28	0,0212	±	0,0139	0,0096	±	0,0025	+
fructose-bisphosphate aldolase, class I	65	Moderado	311	7	24	0,0300	±	0,0230	0,0116	±	0,0027	+
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	39	Moderado	308	9	26	0,0496	±	0,0081	0,0432	±	0,0155	=
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like	21	Moderado	542	12	43	0,3184	±	0,0269	0,1008	±	0,0128	+
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like	66	Moderado	423	5	19	0,0326	±	0,0184	0,0086	±	0,0013	+
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like	23	Moderado	659	9	33	0,4727	±	0,0436	0,1044	±	0,0102	+
nucleoside diphosphate kinase	54	Moderado	274	6	18	0,1073	±	0,0085	0,0485	±	0,0061	+
Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent	72	Moderado	371	18	30	0,0773		0,0087		ND		+
S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	94	Moderado	133	6	16	0,2932	±	0,0405	0,0896	±	0,0089	+
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	81	Moderado	149	4	15	0,1397	±	0,0223	0,0551	±	0,0014	+
triosephosphate isomerase	56	Moderado	599	10	38	0,0784	±	0,0131	0,0221	±	0,0044	+
Aldolase superfamily protein	101	Severo	130	6	25	0,2808	±	0,0258		ND		+
Aldolase superfamily protein	102	Severo	183	6	25	0,2903	±	0,0049		ND		+
Aldolase superfamily protein	103	Severo	144	8	30	0,1821	±	0,0099		ND		+
Aldolase superfamily protein	104	Severo	104	4	20	0,2053	±	0,0050		ND		+
Aldolase superfamily protein	105	Severo	163	7	28	0,1792	±	0,0073		ND		+
Cytosol aminopeptidase family protein	93	Severo	258	13	32	0,1006	±	0,0160	0,1053	±	0,0070	=
glutamine synthase clone R1	91	Severo	115	5	22	0,0984	±	0,0092	0,0921	±	0,0015	=
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2	84	Severo	156	5	21	0,1104	±	0,0016	0,0626	±	0,0056	+
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2	86	Severo	158	4	18	0,1043	±	0,0035	0,0283	±	0,0061	+
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like	20	Severo	555	9	32	0,1036	±	0,0222	0,0253	±	0,0082	+
Malate dehydrogenase	126	Severo	829	9	42	0,0948	±	0,0095	0,0611	±	0,0055	+
Malate dehydrogenase	127	Severo	216	6	30	0,0858	±	0,0058	0,0515	±	0,0093	+
Malate dehydrogenase	128	Severo	163	5	28	0,1034	±	0,0092	0,0467	±	0,0035	+
Nucleoside diphosphate kinase family protein	75	Severo	201	5	31	0,1080	±	0,0021	0,0644	±	0,0031	+
O-methyltransferase 1	92	Severo	95	3	12	0,0939	±	0,0116	0,0890	±	0,0160	=
Oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	87	Severo	422	9	43	0,1005	±	0,0092		ND		+
Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent	99	Severo	173	6	11	0,0950	±	0,0045	0,0510	±	0,0048	+
Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent	100	Severo	164	6	12	0,1304	±	0,0073	0,0805	±	0,0053	+
Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent	80	Severo	79	4	18	0,4532	±	0,0208	1,1520	±	0,0519	-
S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	94	Severo	133	6	16	0,1090	±	0,0488	0,1036	±	0,0329	=
S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	81	Severo	149	4	15	0,2142	±	0,0017	0,0964	±	0,0061	+

triosephosphate isomerase	33	Severo	472	11	39	0,1032	±	0,0036	0,0201	±	0,0044	+
METABOLISMO SECUNDÁRIO												
chalcone isomerase 2	15	Irrigado	397	8	50	1,3049	±	0,1026	1,3500	±	0,0611	=
isoflavone reductase homolog 2	18	Irrigado	602	12	35	0,2562	±	0,0315		ND		+
chalcone isomerase 2	60	Moderado	307	8	43	1,4206		0,1035	0,9180		0,0610	+
Cobalamin-independent synthase family protein	73	Moderado	159	12	22	0,1205	±	0,0133	0,0526	±	0,0168	+
FUNÇÃO NÃO CONHECIDA												
uncharacterized protein LOC100499848	7	Irrigado	2303	4	37	0,0814	±	0,0095	0,0832	±	0,0027	=
uncharacterized protein LOC100527208	31	Irrigado	316	5	34	0,0108	±	0,0013	0,0381	±	0,0026	-
uncharacterized protein LOC100799358	41	Irrigado	421	11	45	0,0131	±	0,0026	0,0159	±	0,0044	=
uncharacterized protein LOC100807342	22	Irrigado	1199	10	62	0,1084	±	0,0052	0,0543	±	0,0061	+
unknown	16	Irrigado	1157	9	42	0,2031	±	0,0021	0,0822	±	0,0099	+
MLP-like protein 43	53	Moderado	408	4	37	0,0309	±	0,0061	0,0539	±	0,0037	-
MLP-like protein 44	55	Moderado	261	6	51		ND		0,0507	±	0,0084	-
uncharacterized protein LOC100500685	52	Moderado	348	7	45	0,0631	±	0,0053	0,0409	±	0,0092	+
uncharacterized protein LOC100784252	62	Moderado	730	17	48	0,0529	±	0,0083	0,0085	±	0,0010	+
uncharacterized protein LOC100807342	22	Moderado	1199	10	62	0,3228	±	0,0314	0,0932	±	0,0115	+
MLP-like protein 43	74	Severo	291	5	43	0,2059	±	0,0109	0,0954	±	0,0037	+
MLP-like protein 43	76	Severo	134	5	34	0,0813	±	0,0116	0,2782	±	0,0743	-
copper ion binding;cobalt ion binding;zinc ion binding	79	Severo	146	3	15	0,4642		0,0194	1,0189	±	0,1157	-
uncharacterized protein LOC100807342	22	Severo	1199	10	62	0,2860	±	0,0222	0,1084	±	0,0013	+
PROTEÓLISE												
proteasome subunit alpha type-6	11	Irrigado	372	8	20	0,0479	±	0,0083	0,0425	±	0,0045	=
RESERVA												
stem 31 kDa glycoprotein precursor	8	Irrigado	132	5	15	0,1041	±	0,0013	0,0522	±	0,0026	+
stem 31 kDa glycoprotein precursor	9	Irrigado	145	5	16	0,0552	±	0,0060	0,0311	±	0,0061	+
stem 31 kDa glycoprotein precursor	32	Severo	161	5	18	0,7606	±	0,0810	0,1379	±	0,0126	+

O sinal (+) indica regulação positiva ou maior nível de fosforilação no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao sensível (BR 16), (-) indica regulação negativa ou menor nível de fosforilação no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao sensível (BR 16), (=) indica que não houve diferença na fosforilação entre os cultivares e ND indica que não foi detectado fosforilação em um dos cultivar. DP = desvio padrão. Os valores representam as médias da percentagem em volume (abundancia relativa) ± o desvio padrão de três réplicas biológicas.

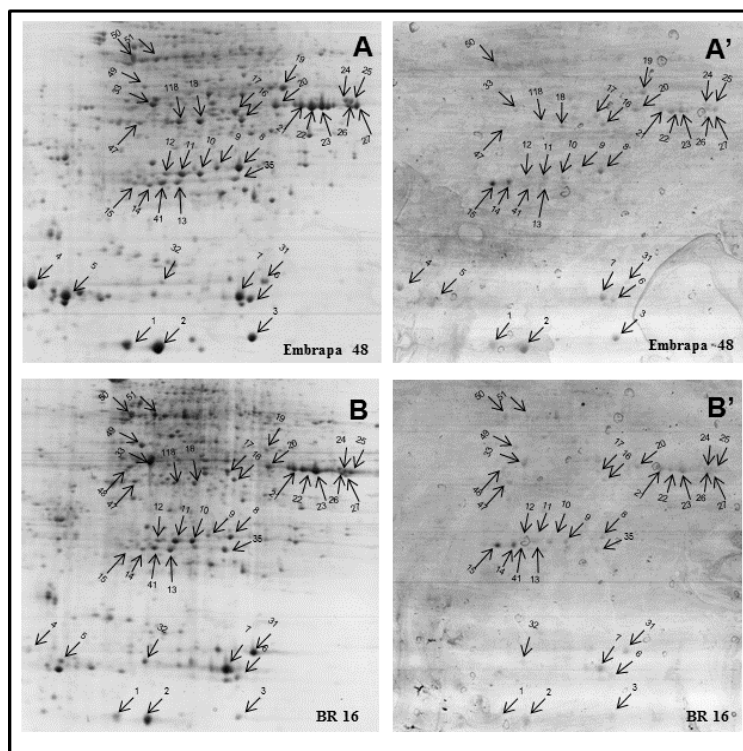


Figura 1. Fosfoproteínas de raízes de soja no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao cultivar sensível (BR 16) sob condições irrigadas (controle). As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 3-10, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com *Coomassie* coloidal (A e B) e com o corante fluorescente Pro-Q DPS (A' e B'). A expressão foi analisada no *software ImageMaster 2D Platinum*.

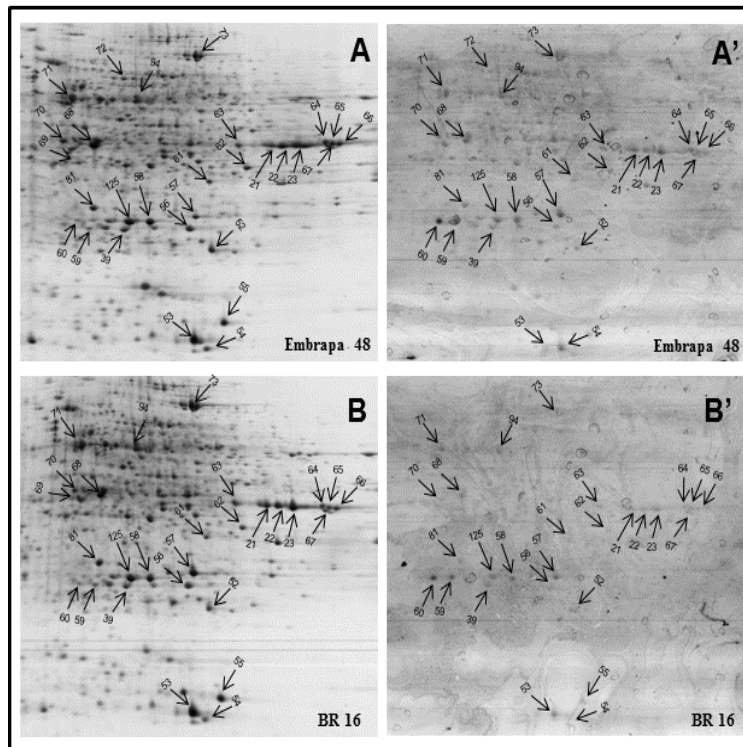


Figura 2. Fosfoproteínas de raízes de soja no cultivar tolerante (Embrapa 48) em relação ao cultivar sensível (BR 16) sob condições de déficit moderada (-1,0 MPa). As proteínas foram isofocalizadas em gradiente linear de pH 3-10, posteriormente separadas por 2D/SDS-PAGE e coradas com *Coomassie* coloidal (A e B) e com o corante fluorescente Pro-Q DPS (A' e B'). A expressão foi analisada no *software ImageMaster 2D Platinum*.

