

**ESTRATÉGIAS PROTEÔMICAS PARA O ESTUDO DE ESTRESSES
BIÓTICOS E ABIÓTICOS NO MELHORAMENTO DE PLANTAS**

CAIO CÉZAR GUEDES CORRÊA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2020**

**ESTRATÉGIAS PROTEÔMICAS PARA O ESTUDO DE ESTRESSES
BIÓTICOS E ABIÓTICOS NO MELHORAMENTO DE PLANTAS**

CAIO CÉZAR GUEDES CORRÊA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Genética e Melhoramento de
Plantas”

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Silveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

C824

Corrêa, Caio César Guedes.

Estratégias proteômicas para o estudo de estresses bióticos e abióticos no melhoramento de plantas / Caio César Guedes Corrêa. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.

89 f. : il.

Bibliografia: 57 - 77.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020.

Orientador: Vanildo Silveira.

1. Proteômica shotgun. 2. *Bipolaris maydis*. 3. milho pipoca. 4. estresse salino. 5. soja. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

ESTRATÉGIAS PROTEÔMICAS PARA O ESTUDO DE ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NO MELHORAMENTO DE PLANTAS

CAIO CÉZAR GUEDES CORRÊA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas”

Aprovada em 19 de fevereiro de 2020.

Comissão Examinadora:



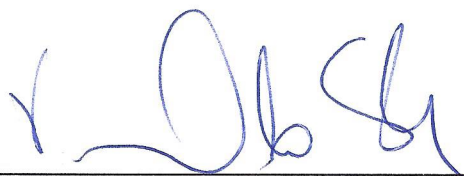
Prof. Paulo Eduardo Teodoro (D.Sc., Genética e Melhoramento) - UFMS



Prof. Antonio Teixeira do Amaral Júnior (D.Sc., Genética e Melhoramento) - UENF



Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho (D.Sc., Biociências e Biotecnologia)
UENF



Prof. Vanildo Silveira (D.Sc., Biotecnologia) – UENF
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família e amigos. Dedico também a Flavia Alves da Silva, minha
companheira nessa jornada

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador Vanildo Silveira, que me recebeu e me apoiou durante todo o doutorado. Mais que um orientador, foi uma pessoa presente na construção de grande parte do conhecimento que tenho hoje.

Agradeço também a Flavia Alves da Silva, pelo apoio em tempo integral, dentro e fora da universidade. Juntos, conseguimos unir forças e ir mais longe.

Quero registrar também um grande agradecimento aos membros do grupo de Pesquisa em Biotecnologia Vegetal, pelos ensinamentos, auxílios nos experimentos e convívio.

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, por tornar possível a obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, fornecendo todo o suporte estrutural e didático.

Agradeço à Capes, pela concessão da bolsa de estudos que permitiu minha permanência longe da estrutura da família. Menciono também agradecimentos à Faperj e ao CNPq, que, indiretamente, financiaram projetos e recursos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVO GERAL	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3. CAPÍTULOS	5
3.1. RESPOSTAS DIFERENCIAIS DE MILHO PIPOCA SOB ESTRESSE POR <i>BIPOLARIS MAYDIS</i>, USANDO A ABORDAGEM PROTEÔMICA LABEL FREE	5
3.1.1. INTRODUÇÃO	5
3.1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1.2.1. Melhoramento visando resistência a doenças	7
3.1.2.2. Bases moleculares da interação patógeno x hospedeiro	9
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1.3.1. Material vegetal	11
3.1.3.2. Isolados fúngicos	11
3.1.3.3. Crescimento e inoculação de plantas	11
3.1.3.4. Extração de proteínas.....	12
3.1.3.5. Digestão de proteínas.....	12
3.1.3.6. Análise por espectrometria de massas	13

3.1.3.7. Identificação de proteínas e análise funcional	14
3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1.5. CONCLUSÃO	33
3.2. ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA EM DIFERENTES CULTIVARES DE SOJA SOB ESTRESSE SALINO	34
3.2.1. INTRODUÇÃO	34
3.2.2. REVISÃO	37
3.2.2.1. Estratégias moleculares para melhoramento de soja sob estresse salino	37
3.2.2.2. Mecanismos de defesa contra estresse salino em soja.....	39
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.2.3.1. Material vegetal e condições	41
3.2.3.2. Preparo de amostras proteicas.....	42
3.2.3.3. Bioinformática e Análises Estatísticas	44
3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.2.5. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

RESUMO

CORRÊA, Caio César Guedes; DSc Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro de 2020; ESTRATÉGIAS PROTEÔMICAS PARA O ESTUDO DE ESTRESSES ABIÓTICOS E BIÓTICOS NO MELHORAMENTO DE PLANTAS; Orientador: Prof. Vanildo Silveira; Conselheiros: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho e Prof. Antônio Teixeira do Amaral.

A redução de produtividade das culturas tem contribuído para o desequilíbrio da demanda e oferta de alimento em todo o mundo. Entre os fatores limitantes para as importantes culturas do milho pipoca e da soja, estão estresses bióticos como doenças e estresses abióticos como o salino. Em milho pipoca, estudamos o estresse biótico causado pela helmintosporiose de *Bipolaris maydis* (SLB). A SLB resulta em perdas significativas na produção agrícola, gerando prejuízos aos produtores. Assim como no milho comum, não há variedades resistentes de milho pipoca disponíveis comercialmente, e essa característica tem sido objeto de estudo em muitos programas de melhoramento de milho pipoca. Na cultura da soja, estudamos os efeitos do estresse salino. Na soja, são escassas as cultivares tolerantes, e o desempenho sob o estresse é muito reduzido, o que causa grande impacto na agricultura mundial. As respostas das plantas ao estresse salino são complexas e levam a rotas metabólicas complexas, com genes específicos expressos na condição de estresse. O presente estudo teve como objetivo identificar proteínas diferencialmente acumuladas (DAP), associadas tanto à

resistência a *B. maydis* em milho pipoca, quanto DAPs associadas com estresse salino em soja, utilizando a análise proteômica comparativa. Ambos os experimentos foram conduzidos utilizando genótipos contrastantes. O genótipo de milho pipoca resistente exibiu lesões foliares menores em comparação com o genótipo suscetível à SLB, tendo sido identificadas 717 proteínas. Além disso, foram identificadas DAPs no milho pipoca relacionadas à resposta ao estresse, resposta ao estímulo, fotossíntese, crescimento celular, processo de manutenção e desintoxicação, que podem estar envolvidos na resposta da planta ao patógeno. Foram identificadas proteínas relacionadas à via do ácido salicílico, juntamente com proteínas de ligação de nucleotídeos ricas em leucina. Essas proteínas podem ser responsáveis por iniciar uma resposta ao fungo na linhagem resistente L66. Uma resposta diferencial também foi identificada nas proteínas cloroplásticas, principal organela envolvida na percepção do fungo para iniciar uma resposta de sinalização. Já na soja, foram identificadas 1831 proteínas, entre elas algumas DAPs up-acumuladas no genótipo resistente estavam diretamente relacionadas com o estresse, anotadas em transporte de proteínas, resposta a estresse e homeostase celular, com poucas sendo responsáveis pela sinalização envolvendo ácido jasmônico para iniciar uma resposta. O genótipo resistente apresentou DAPs envolvidas em processos biológicos de processo metabólico, de carboidratos, lipídico e processo celular e energia. A maioria das DAPs pertencentes a esses processos estavam down-acumuladas no genótipo resistente, indicando uma possível redução da atividade metabólica, provavelmente para alocar recursos para suportar o estresse sem comprometer os tecidos vegetais. Notou-se pouca diferença na resposta do genótipo resistente ao estresse. Isso pode significar um desafio para o melhoramento em obter novas cultivares produtivas com resistência ao estresse salino, pois, aparentemente, o genótipo suscetível tem desenvolvimento mais acelerado embora não resista ao estresse. Em ambos os estudos, foram verificadas significativas alterações no perfil proteômico nas plantas resistentes que podem ser eficazes na resposta aos estresses. Por fim, foi sugerida uma lista com potenciais candidatos a biomarcadores para futuras pesquisas de melhoramento genético visando a desenvolver genótipos resistentes.

ABSTRACT

CORRÊA, Caio César Guedes; DSc Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; february, 2020; PROTEOMIC APPROACHES FOR THE STUDY OF BIOTIC AND ABIOTIC STRESSES IN PLANT BREEDING; Advisor: Prof. Vanildo Silveira; Committe Membrers: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho e Prof. Antônio Teixeira do Amaral.

The reduction in crop productivity has contributed to the imbalance of food demand and supply worldwide. Among the factors that constitute limitations for the important corn and soybean crops, are biotic stresses such as diseases and abiotic stresses such as salt stress. In popcorn we studied the biotic stress caused by Southern Leaf Blight of *Bipolaris maydis* (SLB). SLB results in significant losses in agricultural production and generates losses for producers. As with common corn, there are no resistant varieties of popcorn available commercially and this characteristic has been the subject of study in many popcorn breeding programs. In soybean culture we study the effects of saline stress. In soybeans tolerant cultivars are scarce, and performance under stress is very low, which has a major impact on world agriculture. Plant responses to salt stress are complex and lead to complex metabolic pathways with specific genes expressed in the stress condition. The present study aimed to identify differentially accumulated proteins (DAPs) associated with both resistance to *B. maydis* in popcorn, and DAPs associated with salt stress in soybean, using comparative proteomic analysis. Both experiments were conducted using contrasting genotypes. The resistant popcorn maize genotype exhibited smaller leaf

lesions compared to the genotype susceptible to SLB, in total 717 proteins were identified. In addition, DAPs have been identified in popcorn related to the stress response, stimulus response, photosynthesis, cell growth, maintenance and detoxification process, which may be involved in the plant's response to the pathogen. Proteins related to the salicylic acid pathway have been identified along with leucine-rich nucleotide-binding proteins. These proteins may be responsible for initiating a response to the fungus in the resistant L66 inbred line. A differential response has also been identified in chloroplastic proteins, which is the main organelle involved in the perception of the fungus to initiate a signaling response. In the soybean 1831 proteins were identified, among these, some DAPs up-accumulated in the resistant genotype were directly related to stress, with functional annotation protein transport, stress response and cell homeostasis with few being responsible for signaling involving jasmonic acid to initiate a response. The resistant genotype presented several DAP proteins involved in biological processes of metabolic, carbohydrate, lipid, cellular processes and energy. Most DAPs belonging to these processes were down-accumulated in the resistant genotype, indicating a possible reduction in metabolic activity, probably to allocate resources to withstand stress without compromising plant tissues. Little difference was noted in the response of the stress-resistant genotype, such as plant size and protein accumulation. This can mean a challenge for the improvement in obtaining new productive cultivars with resistance to saline stress, since apparently the susceptible genotype has a more accelerated development, although it cannot resist stress. In both studies, significant changes in the proteomic profile of resistant plants were found, which can be effective in responding to stresses. Finally, a list of potential candidates for biomarkers was suggested for future genetic improvement research to develop resistant genotypes.

1. INTRODUÇÃO

As culturas da soja (*Glycine max* L.) e do milho (*Zea mays* L.) são as mais importantes no cenário agrícola no Brasil, ocupando a primeira e segunda posição, respectivamente, na produção de grãos no país. Atualmente, existem diversas cultivares com elevada capacidade produtiva disponíveis no mercado. Entretanto, mesmo essas cultivares podem não desempenhar todo seu potencial pelo efeito de estresses bióticos e abióticos a que estão sujeitas no campo (Zörb et al., 2019).

Essas duas culturas são amplamente difundidas no mundo e, durante todo o ciclo, são expostas às mais variadas condições de estresses bióticos e abióticos. Por exemplo, algumas práticas como a adoção do plantio direto, irrigação, cultivo sucessivo e ausência de rotação de culturas, quando associadas às condições ambientais tropicais como no Brasil, permitem o desenvolvimento e a ocorrência de patógenos que se multiplicam rapidamente e com maior facilidade. As doenças fúngicas, por exemplo, são as principais causas de perdas em lavouras de milho, cuja ocorrência pode limitar o desenvolvimento quantitativo e qualitativo da cultura, proporcionando menor produtividade (Gaikpa e Miedaner, 2019).

Outros fatores que afetam a produção agrícola nessas culturas são as condições do ambiente de desenvolvimento, geralmente quando não favoráveis são denominados de estresses abióticos. Entre os estresses abióticos, o estresse salino no solo causa grandes perdas (Mendes et al., 2017). Entre seus principais efeitos, tem sido analisado que esse estresse desencadeia uma série de danos

morfológicos, estruturais e metabólicos, capazes de limitar consideravelmente o crescimento e a produção de diversas culturas (Fan, 2019). No Brasil, estima-se que 25% das áreas irrigadas apresentem problemas de salinidade em decorrência do inadequado manejo do sistema de produção e que, aproximadamente, 36 % do solo já utilizado para cultivo apresenta algum nível de excesso de sais em razão de um manejo incorreto (Li et al., 2019a).

Esses estresses afetam diversos processos fisiológicos e bioquímicos que comprometem o funcionamento celular e afetam os processos biológicos (Feng et al., 2020). Mas felizmente, com os recentes avanços, tornou-se possível investigar com maior profundidade os mecanismos moleculares associados às respostas e resistência a estresses bióticos e abióticos. O uso de ferramentas moleculares, como a proteômica, permite uma análise funcional de proteínas envolvidas em diversas condições. Para tanto, a identificação de alguns exemplares tanto em milho como em soja, que têm uma resposta contrastante de resistência ao estresse, é fundamental para esses estudos.

Esses exemplares utilizados como parâmetros de comparação têm mostrado que podem responder a doenças e à salinidade com alterações fisiológicas e metabólicas para uma maior resistência, de acordo com os genes que têm e principalmente quais desses genes são ativados. Essas alterações a nível molecular ocorrem inicialmente com a ativação de fatores transcricionais, que acarretam uma série de mecanismos atuando em conjunto para conferir resistência. As respostas geralmente estão relacionadas com a síntese e ativação de proteínas, com funções específicas tais como rápida percepção e transmissão de sinais, proteção às membranas, às enzimas e ao DNA das células (Feng et al., 2020).

Em geral, a aplicação da proteômica no melhoramento genético de plantas pode ser iniciada com a detecção de proteínas responsivas aos efeitos bióticos ou abióticos, que se tornam mais ou menos acumuladas nos indivíduos de interesse. Estudos na área de estresses abióticos como seca (Meng et al., 2019), temperatura (Takahashi et al., 2019), salinidade (Guo et al., 2019) e estresses bióticos (Reid e Altosaar, 2019; Wang et al., 2019) empregaram a análise de proteínas diferencialmente acumuladas com o intuito principal de fornecer base à descoberta de novos candidatos a marcadores moleculares.

Em razão das condições ambientais e da constante ocorrência de doenças nos sistemas de cultivo do mundo todo, torna-se indispensável o conhecimento do metabolismo vegetal das principais culturas utilizadas na agricultura mundial. Essas investigações moleculares identificando proteínas associadas direta ou indiretamente às reações que ocorrem em plantas de milho e soja expostas aos estresses bióticos e abióticos podem representar uma nova estratégia para identificar os mecanismos responsáveis pela resistência. O próximo passo é verificar se o comportamento das proteínas está em consonância com a característica de interesse ou com um QTL (locomotivas de caracteres quantitativos), permitindo a integração de genes de interesse em programas de melhoramento genético assistido por marcadores moleculares ou ainda em programas que incluam a transformação genética (Salekdeh e Komatsu, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi a identificação de proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs), associadas a respostas aos estresses bióticos e abióticos em soja e milho, respectivamente.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar proteínas diferencialmente acumuladas envolvidas na resposta de defesa contra *B. maydis* de duas linhagens de milho pipoca contrastantes (uma resistente e outra suscetível) inoculadas com esse fungo.

O objetivo deste trabalho foi investigar proteínas diferencialmente acumuladas envolvidas com as vias de resposta contra o estresse salino em dois genótipos contrastantes de soja (um resistente e outro suscetível), submetidos à irrigação com solução contendo 120 mM de NaCl.

3. CAPÍTULOS

3.1. RESPOSTAS DIFERENCIAIS DE MILHO PIPOCA SOB ESTRESSE POR *BIPOLARIS MAYDIS*, USANDO A ABORDAGEM PROTEÔMICA LABEL FREE

3.1.1. INTRODUÇÃO

A helmintosporiose (SLB; sigla em inglês para *Southern Leaf Blight*) é causada pelo fungo *Bipolaris maydis* (*Y. nisik* e *C. miyake*), provocando perda considerável na produção de milho em todo o mundo. Os sintomas desta doença incluem: i) folhas com lesões marrons, às vezes com uma coloração arroxeada ou margem marrom avermelhada, ocasionalmente zoneadas, coalescentes, se tornando acinzentadas; ii) lesões com 2,5 cm de comprimento, inicialmente elípticas, depois alongadas longitudinalmente, tornando-se retangulares quando os pontos são restringidos pelas veias (Manamgoda et al., 2014). O SLB causa grandes perdas na produção agrícola e seu controle é difícil porque o patógeno sobrevive nos restos culturais e ainda consegue usar o milheto e o sorgo para completar seu ciclo de vida (Mubeen et al., 2017). Além de hospedeiros alternativos, o melhor controle dessa doença é o uso de genótipos resistentes, mas não há cultivares resistentes de milho disponíveis para cultivo comercial.

Algumas plantas hospedeiras desenvolveram vários mecanismos de defesa para a maioria dos patógenos, a fim de evitar serem infectados, matar ou remover o patógeno ou, pelo menos, reduzir seu efeito prejudicial. Isso ocorre devido a um sofisticado sistema de vigilância para detectar microrganismos patogênicos invasores (Meng e Zhang, 2013). As plantas hospedeiras podem ativar uma ampla variedade de mecanismos de defesa após a detecção de patógenos, incluindo desintoxicação oxidativa rápida, compostos antimicrobianos, deposição de calose e iniciação de vias de sinalização, levando à presença de proteínas relacionadas a patógenos (PR) (Bigeard et al., 2015).

Os patógenos são percebidos por duas camadas de sistemas de reconhecimento nos hospedeiros: i) imunidade induzida por padrão molecular associado a patógenos (PAMP), que reconhece as moléculas conservadas dos patógenos usando receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e ii) imunidade desencadeada por efetores (ETI), com base nas interações gene a gene, nas quais as proteínas PR percebem efetores patogênicos específicos de diversos patógenos vegetais para neutralizar seus genes correspondentes à avirulência (Avr) (Jones e Dangl, 2006; Wu et al., 2014; Bigeard et al., 2015).

A resistência sistêmica adquirida (SAR) ativa algumas proteínas responsáveis por induzir respostas fisiológicas locais rápidas, resultando em uma reação de resistência localizada, chamada de respostas hipersensíveis (HR). Isso geralmente resulta em uma rápida morte celular no local da infecção, induzida por espécies reativas de oxigênio (ROS) (Klaus e Heribert, 2004). Posteriormente, ocorrem a biossíntese e o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PR), principalmente no local da infecção e também nos tecidos sistêmicos, proporcionando uma resistência sistêmica de amplo espectro (Wu et al., 2014; Zeilinger et al., 2016).

A SAR já foi descrita em algumas interações planta-patógeno. Por exemplo, no tabaco, uma resposta semelhante é ativada após a infecção com várias ameaças. Entre eles, alguns vírus (TMV e TNV), infecção bacteriana (*Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora*) e fungos (*Phytophthora parasitica*, *Cercospora nicotianae* e *Peronospora tabacina*). No entanto, essa proteção não é eficaz contra todos os patógenos. Por exemplo, não há redução significativa dos

sintomas da doença causados por *Botrytis cinerea* ou *Alternaria alternata* (Ryals et al., 1996).

As proteínas PR foram encontradas em alguns estudos proteômicos de interações de fungos com patógenos no milho, demonstrando mudanças significativas no perfil da proteína em genótipos resistentes (Pechanova e Pechan, 2015). Por exemplo, entre alguns pontos-chave na interação do milho com *Aspergillus flavus* e *Fusarium spp.*, foi identificado um inibidor de tripsina, causando ruptura de esporos e crescimento anormal de hifas e outras proteínas PR (Chen et al., 2007; Mohammadi et al., 2011). Alguns dos genes que conferem resistência do milho contra *A. flavus* e *Fusarium spp.* estão geneticamente ligados, com efeito poligênico, quantitativamente herdados e fortemente influenciados pelo meio ambiente (Paul et al., 2003).

A compreensão dos mecanismos de resistência do milho pipoca contra *B. maydis* pode fornecer uma base sólida para o melhoramento de plantas para aumentar a resistência a doenças. As proteínas são um produto genético e uma ferramenta importante que abre novos caminhos para a identificação de genes ativos como candidatos a biomarcadores. No entanto, a investigação das proteínas envolvidas na resposta de resistência da interação entre *B. maydis* e milho pipoca permanece incerta.

3.1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.2.1. Melhoramento visando resistência a doenças

A redução de produtividade das culturas tem contribuído para o desequilíbrio da demanda e oferta de alimento em todo o mundo. Entre os fatores limitantes para a importante cultura do milho, estão as doenças que, em condições favoráveis como em regiões tropicais, aumentam em severidade acompanhando a expansão de área cultivada e a indisponibilidade de cultivares geneticamente resistentes.

A resistência a doenças é uma preocupação constante em programas de melhoramento de milho e estudos sobre a variabilidade de patógenos e a natureza

da resistência nas condições brasileiras são imprescindíveis para um adequado controle das doenças que atacam o cereal. Isto porque o controle de doenças com o uso de variedades resistentes é mais barato e de fácil utilização. Outras vantagens são a menor agressão ao meio ambiente de maneira geral na cadeia produtiva do milho, pois evita o uso de agrotóxicos (Borém et al., 2017).

No milho, o controle de importantes doenças podem ser feito pela utilização de variedades resistentes. Há três etapas básicas que devem ser consideradas em qualquer programa de obtenção e utilização de variedades resistentes: 1) Identificar fontes de resistência, ou seja, identificar no germoplasma genótipos que tenham genes de resistência; 2) Incorporar estes genes em cultivares comerciais por meio dos métodos de melhoramento; 3) Após a obtenção de uma cultivar resistente, traçar a melhor estratégia para que a resistência seja durável face à natureza dinâmica das populações patogênicas (BESPALHOK et al., 2007).

Entre as atividades que geram informações úteis para programas de melhoramento, estão aqueles referentes aos estudos da variabilidade genética dos patógenos e hospedeiros, avaliação e caracterização de linhagens resistentes e da herança da resistência. Este trabalho aborda a utilização de uma avançada ferramenta de biologia molecular funcional, a proteômica, no processo de identificação de proteínas associadas à resistência em milho pipoca contra *B. maydis*, a primeira etapa para obtenção de cultivares resistentes em programas de melhoramento.

O tipo mais frequente de herança da resistência a patógenos parece ser simples, com apenas um ou dois genes envolvidos. A herança pode ser tanto dominante quanto recessiva, havendo predominância de genes de resistência dominantes. Obviamente, existem inúmeros casos em que a herança da resistência é complexa e envolve muitos genes. Um complicador no entendimento da relação hospedeiro x patógeno é a interação desse sistema com o ambiente (Borém et al., 2017). Assim, a análise proteômica atua com uma importante ferramenta para auxiliar a identificar quais proteínas podem estar sendo ativadas em genótipos resistentes.

A estratégia de melhoramento visando à obtenção da resistência a doenças é relativamente simples quando se objetiva a introdução de poucos genes que conferem resistência. O procedimento mais indicado é o uso do método do

retrocruzamento, combinado com a inoculação artificial para selecionar indivíduos resistentes na descendência. Contudo, quando há mais genes envolvidos com a resistência, a piramidação é o método mais eficiente (Borém et al., 2017). Esse método se caracteriza pela introgressão de vários genes de resistência em um único genótipo (Pedersen e Leath, 1988) e se torna muito mais eficiente se for utilizada uma seleção assistida por marcadores.

3.1.2.2. Bases moleculares da interação patógeno x hospedeiro

Nos últimos anos, a biologia molecular avançou rapidamente com a identificação de muitos genes de resistência em diversas espécies de interesse agrônômico. Tem sido observado que as proteínas codificadas por esses genes têm muitas características em comum, sugerindo que os mecanismos de ação podem ser similares (Davies et al., 2000).

As plantas reagem à infecção causada pelo patógeno com respostas de rotas bioquímicas específicas. Embora relativamente pouco seja entendido sobre mecanismos de resistência molecular, a hipersensibilidade e a resistência sistêmica adquiridas, que agem de forma generalizada em diferentes patógenos, estão relativamente bem caracterizadas (Borém et al., 2017)

Um dos primeiros modelos de interação patógeno x hospedeiro foi proposto por (Flor 1947, apud Loegering, 1984) como resultado de seus estudos com o patossistema linho x *Melampsora lini*, agente causal da ferrugem do linho. Tendo como referência seus resultados, o autor formulou a teoria gene a gene, na qual a resistência de determinada cultivar de linho a uma raça do fungo resulta da interação entre um gene de avirulência dominante (Avr) no patógeno e um gene de resistência correspondente (R), também dominante, na planta hospedeira. Após esse pioneiro trabalho, resultados semelhantes têm sido obtidos em outros patossistemas envolvendo parasitas biotróficos, hemibiotróficos, incluindo fungos, bactérias, vírus e nematoides (Agrios, 2005).

O modelo da interação gene a gene assume a existência de uma interação do tipo receptor x elicitor, em que o gene de resistência no hospedeiro é responsável pela síntese de proteínas receptoras, que reconhecem e reagem especificamente com uma molécula elicitora produzida pelo patógeno (Yarwood, 1970). Os genes Avr codificam para antígenos que interagem especificamente com

o produto dos genes de resistência (R), levando à incompatibilidade (ausência de doença). Geralmente essa resposta de defesa se dá pela ativação da reação de hipersensibilidade (HR), que consiste na morte rápida de um número limitado de células em torno do sítio inicial da infecção.

Por outro lado, se o patógeno não tiver um gene Avr, ele não será reconhecido pela planta hospedeira, resultando numa interação compatível (presença da doença) (Johal et al., 1995). Funcionalmente, a HR por si é suficiente para restringir o crescimento de patógenos biotróficos, os quais requerem células vivas para crescer no seu hospedeiro. Todavia, para conter patógenos necrotróficos (aqueles que colonizam apenas células mortas), a HR atua por meio de outros mecanismos (Johal e Rahe, 1990). Esses mecanismos podem funcionar única ou sinergicamente e incluem acúmulo de fitoalexinas, fenóis e proteínas PR (proteínas relacionadas com a patogênese, quitinases e glucanases, por exemplo), além da elaboração de barreiras estruturais nas células vizinhas ao sítio de infecção, incluindo lignificação, deposição de calose e silício e a produção de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (Johal et al., 1995).

De acordo com esse modelo, a resistência ao patógeno é herdada de forma dominante e a virulência ao patógeno, como uma característica recessiva. A resistência à doença só ocorrerá quando o patógeno apresentar o gene de Avr, e o hospedeiro, o gene de resistência R correspondente. Qualquer outra situação resulta em suscetibilidade. Quando uma cultivar tem dois genes ou mais para resistência (R1, R2...) contra um patógeno particular, cada um desses genes corresponde a um ou mais genes para formar virulência/avirulência no patógeno (a1, a2...). Estes, uma vez reconhecidos por um dos genes para resistência no hospedeiro, funcionam como genes de avirulência no patógeno (Agrios, 2005).

Neste contexto, a análise proteômica se apresenta como uma ferramenta promissora. Isso para a identificação de proteínas relacionadas com a resistência a doenças, pois os genes contidos no genoma, geralmente identificados por marcadores moleculares, podem não estar codificando alguma proteína, ou por esta ser modificada. A análise do perfil proteico permite a análise da resposta da interação entre o patógeno x hospedeiro.

Neste trabalho foram investigadas proteínas diferencialmente acumuladas, envolvidas na resposta de defesa contra *B. maydis* de duas linhagens de milho

pipoca contrastantes (uma resistente e outra suscetível), inoculadas com esse fungo.

3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1. Material vegetal

Duas linhagens L66 e L51, contrastantes de milho pipoca em resposta ao fungo *B. maydis*, foram desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento de Milho Pipoca da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. Em uma triagem de 37 linhagens para selecionar genótipos promissores com resistência genética a doenças fúngicas causadas por *B. maydis*, identificou-se que L66 era resistente e L51 suscetível ao fungo (Kurosawa et al., 2018).

3.1.3.2. Isolados fúngicos

Os isolados utilizados neste trabalho foram coletados em folhas de milho pipoca apresentando sintomas típicos da infecção por *B. maydis* durante o aparecimento espontâneo da doença nos campos de multiplicação de germoplasma do Programa de Melhoramento de Milho Pipoca da UENF. Posteriormente, as estruturas reprodutivas do fungo foram observadas em microscópio óptico. Foram visualizados conídios curvos cônicos nas extremidades com 3 a 13 septos e germinação bipolar. Os isolados monospóricos do fungo foram mantidos em placas de ágar em meio PDA (extrato de batata a 20%, dextrose a 2%, ágar a 2%) e incubados por dez dias a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas, em incubadora tipo DBO.

3.1.3.3. Crescimento e inoculação de plantas

As sementes de ambas as linhagens foram colocadas em vasos plásticos (capacidade de 5L) com uma mistura de areia e substrato orgânico da planta (1:1, v/v) em casa de vegetação, e regadas diariamente. Três plantas por vaso e cinco

vasos constituíram uma unidade experimental para cada condição. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado.

A inoculação de *B. maydis* foi feita no estágio de crescimento V4, pulverizando água com suspensão de conídios (2×10^4 conídios mL⁻¹) nas folhas até o ponto de drenagem. As plantas foram avaliadas aos quatro e dez dias após a inoculação (DAI). Foram coletadas três amostras biológicas para cada tratamento, num total de 12 amostras (dois genótipos x dois tempos de exposição fúngica x 3 repetições). Essas amostras foram constituídas por um conjunto de folhas de cinco plantas de milho pipoca pertencentes a cada unidade experimental, agrupadas em 300 mg de matéria fresca para cada amostra biológica (triplicatas). As amostras foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, mantidas em ultrafreezer até a extração.

3.1.3.4. Extração de proteínas

As proteínas foram extraídas pelo método de precipitação com ácido tricloroacético TCA/acetona, desenvolvido por Damerval et al. (1986), com modificações. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e suspensas em 1 mL de tampão de extração frio, contendo 10% de TCA em acetona, com ditioneitol 20 mM (DTT). As amostras foram então agitadas em vórtex durante 5 minutos a 8 °C. A mistura foi mantida a -20 °C por 1 h, depois, centrifugada a 16.000 g por 30 min a 4 °C. Os pellets resultantes foram lavados três vezes com acetona fria mais DTT 20 mM e centrifugados durante 5 min em cada lavagem. Os pellets foram secos ao ar, suspensos em tampão contendo 7 M de ureia; tiourea 2 M; Triton X-100 a 2%; TDT a 1%; fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM (PMSF) e cocktail completo inibidor de protease. Prosseguiu-se com agitação em vórtex por 30 minutos a 8 °C e centrifugou-se por 20 minutos a 16.000 g. Os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de proteínas, determinadas usando o 2-D Quant Kit.

3.1.3.5. Digestão de proteínas

Para cara réplica biológica, foram tomados 100 µg de proteínas para digestão proteica, utilizando tripsina. Primeiramente as proteínas foram precipitadas usando o protocolo metanol/clorofórmio para remover qualquer

contaminante detergente das amostras (Nanjo et al., 2012). Em seguida, as amostras foram suspendidas em tampão de ureia 7 M e tiourea 2 M e dessalinizadas em filtros Amicon Ultra-0,5 3 kDa por centrifugação. Os filtros foram cheios até a capacidade máxima com tampões e centrifugados a 15.000 g por 10 min a 20 ° C. As lavagens foram feitas mais duas vezes com ureia 8 M e duas vezes com bicarbonato de amônio 50 mM pH 8,5 até permanecer aproximadamente 50 µL no filtro após a última lavagem.

O método de digestão de proteínas foi como descrito anteriormente em Calderan-Rodrigues et al. (2014). Foram adicionados 25 µL de RapiGest® a 0,2% (v/v) para cada amostra com vórtice breve e incubados em Eppendorf Thermomixer® a 80 °C por 15 min. Em seguida, foram adicionados 2,5 µL de DTT 100 mM. Então os tubos foram submetidos a vórtex e incubados a 60 °C por 30 min sob agitação constante. Foi adicionado um total de 2,5 µL de iodoacetamida 300 mM e novamente agitadas em vórtex, com posterior incubação no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. Depois disso, foram adicionados 5 µL de DTT 100 mM para extinguir o excesso de iodoacetamida. A digestão foi feita adicionando 20 µL de solução de tripsina (50 ng/µL), preparada em bicarbonato de amônio 50 mM. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 15h. Para precipitação do RapiGest® e inibição da atividade da tripsina, foram adicionados 10 µL de ácido trifluoroacético a 5% (v/v) (TFA) e incubados a 37 °C por 30 min, seguido de uma etapa de centrifugação de 20 min a 16.000 g . As amostras foram então transferidas para os frascos de recuperação total.

3.1.3.6. Análise por espectrometria de massas

Foi utilizado um nanoAcquity UPLC (Waters) acoplado a um espectrômetro de massas Synapt G2-Si HDMS (Waters) com uma fonte de ionização com eletropulverização (ESI)-MS/MS. Primeiro, para normalizar as quantificações relativas de proteínas, foi feita uma etapa de cromatografia carregando 500 ng das amostras digeridas. Para garantir valores molares padronizados para todas as condições, a normalização entre as amostras foi baseada em medições estequiométricas da contagem total de íons (TIC) em injeções teste e MS^E, usando o programa ProteinLynx Global SERVER v. 3.0 (PLGS).

Após a normalização da amostra, as misturas peptídicas foram separadas por cromatografia líquida, carregando 1 µg de proteínas digeridas em coluna trap C18 nanoAcquity UPLC de 5 µm (180 µm × 20 mm) seguida por carregamento em coluna analítica nanoAcquity HSS T3 1,8 µm (75 µm × 150 mm) a um fluxo de 400 nL min⁻¹ e a uma temperatura de 45 °C. O gradiente binário foi constituído de água ultrapura MS mais ácido fórmico a 0,1% como fase móvel A, e de acetonitrila mais ácido fórmico a 0,1% como fase móvel B para proceder à eluição dos peptídeos. O gradiente de eluição foi iniciado em 7% de solução B, aumentado para 40% por 91,12 minutos, chegando em 99,9% da solução B aos 92,72 minutos, mantendo até 106 minutos, diminuindo para 7% aos 106,1 minutos e, em seguida, mantida em 7% da solução B até o final da execução, em 120 minutos.

A espectrometria de massa foi feita nos modos de resolução (V) e no modo positivo, com largura total na metade máxima (FWHM) em 35000, e a mobilidade iônica, no modo de aquisição independente de dados (DIA). A separação por mobilidade iônica (IMS) utilizou uma velocidade de onda IMS de 600 m.s⁻¹ (HDMS^E); a energia de colisão de transferência aumentou de 19 V para 55 V no modo de alta energia; as voltagens do cone e capilar foram de 30 V e 2750 V, respectivamente; e a temperatura da fonte, de 70 °C. Para os parâmetros de tempo de voo dos íons (TOF), o tempo de varredura foi definido em 0,5 segundos no modo contínuo e a faixa de massa foi de 50 a 2000 Da. O fibrinopeptídeo B [Glu1] de humano a 100 fmol.µL⁻¹ foi usado como um calibrante externo. A aquisição da massa do calibrante externo foi feita a cada 30 segundos. A aquisição do espectro de massa foi feita pelo software MassLynx v.4.0 (Waters).

3.1.3.7. Identificação de proteínas e análise funcional

As condições de processamento espectral e de busca no banco de dados para identificação foram feitas utilizando o software ProteinLynx Global SERVER (PLGS) v.3.02 (Waters). A identificação da proteína foi feita usando o banco de dados *Z. mays* do *UniprotKB* (*Proteome ID: UP000007305*, 03 de maio de 2019). A análise HDMSE seguiu os parâmetros: Apex3D de 150 contagens para limiar de baixa energia; 50 contagens para limiar de energia elevada; 750 contagens para o limiar de intensidade; uma clivagem perdida; mínimo de íons fragmentos por peptídeo igual a três; mínimo de íons fragmentos por proteína igual a sete; mínimo

de peptídeos por proteína igual a dois; modificações fixas em carbamidometil (C) e modificações variáveis de oxidação (M) e fosforilação (STY); taxa de falsa descoberta (FDR) <0,01%; e tolerância automática a peptídeos e fragmentos.

A análise de quantificação foi feita usando o software ISOQuant v.1. 7 (Distler et al., 2014). Os parâmetros utilizados foram: peptídeo e proteína FDR <0,01%; comprimento de sequência com pelo menos seis resíduos de aminoácidos; e pontuação mínima igual a seis peptídeos. O software fez a quantificação relativa das proteínas com base no método TOP3. As abundâncias de peptídeos compartilhados foram redistribuídas para as respectivas proteínas atribuídas, seguida pela quantificação baseada em TOP3, com base nas abundâncias relativas de peptídeos atribuídos de forma exclusiva (Distler et al., 2014).

Para garantir a qualidade do processamento dos dados, somente foram aceitas para a análise de acúmulo diferencial, proteínas presentes ou ausentes (para proteínas exclusivas, quando ausente em genótipo e presente em outro) nas três repetições biológicas. Foram consideradas proteínas diferencialmente acumuladas aquelas que apresentaram médias significativamente diferentes das triplicatas de outro tratamento pelo teste t de Student's emparelhado (valor de p <0,05) e com Log₂ da taxa de acúmulo (*fold change*) maior que 1,5 vezes para proteínas up-acumuladas e menor que 0,667 para proteínas down-acumuladas. Com o objetivo de avaliar os grupos de amostras, foi feita uma análise de componentes principais (PCA) usando *prcomp::stats* v.3.5.1 (R Core Team, 2018, version 3.5.1) e plotada usando *ggbiplot::ggbiplot* v.0.55 (Vu, 2011, version 0.55) no Software R. As anotações funcionais foram feitas usando o software OmicsBox (Conesa et al., 2005) e o software Cytoscape usando o aplicativo Moduland e BiNGO (Maere et al., 2005; Kovács et al., 2010). As plantas foram avaliadas em uma escala de 0-5 para verificar o nível de resistência, de acordo com Hussain et al. (2016).

Os dados proteômicos de espectrometria de massa e os resultados da pesquisa foram depositados no *ProteomeXchange Consortium* (Vizcaino et al., 2014) pelo repositório PRIDE (Vizcaino et al., 2016) com o identificador PXD016768.

3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fungos são os principais agentes causadores de doenças em plantas. As doenças causam perdas na produção e são prejudiciais não apenas à economia, ameaçando também o suprimento de alimentos. Até o momento, vários mecanismos de resistência a fungos foram descritos em plantas cultivadas, mas muito mais necessita ser descoberto para a compreensão dessa característica complexa. Aqui, fornecemos a primeira análise proteômica de alto rendimento, revelando potenciais novos atores envolvidos na interação entre milho pipoca e *B. maydis*.

As características das lesões foliares observadas nas linhagens resistentes e suscetíveis quanto à resposta à infecção por *B. maydis* foram notavelmente diferentes (Figura 1). No quarto DAI, a linhagem suscetível L51 apresentou lesões classificadas como 2 (número moderado de lesões em todas as folhas) e, no décimo dia, apresentou lesões classificadas como 4 (número abundante de lesões em todas as folhas) (Figuras 1B e D). A linhagem resistente L66 exibiu lesões menores no quarto e no décimo DAI com lesões classificadas como 0 (sem doença) e 1 (pequeno número de lesões), respectivamente (Figuras 1A e C).

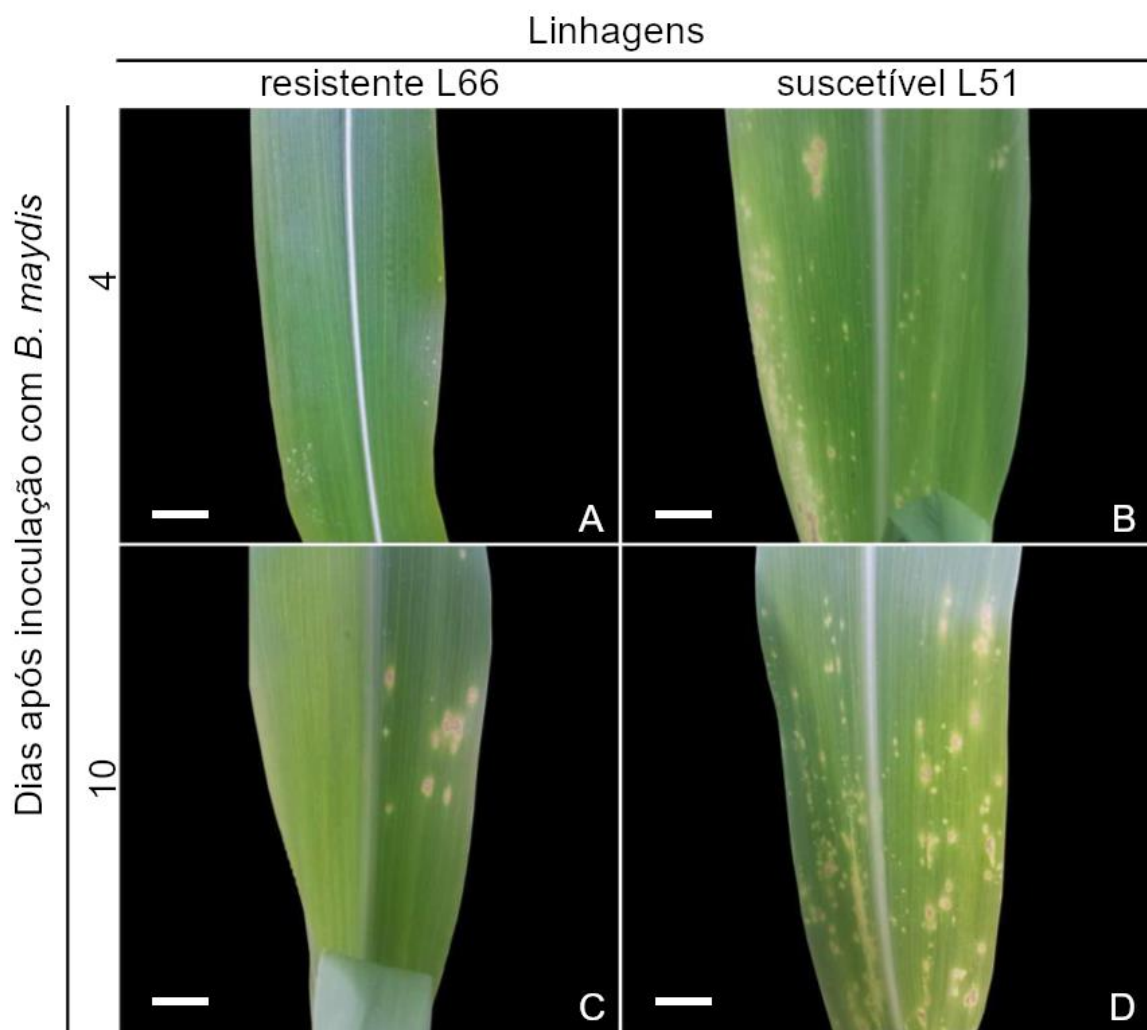


Figura 1. Aspectos da folha de milho pipoca da linhagem resistente L66 (A e C) e da linhagem suscetível L51 (B e D) após quatro DAI (A e B) e 10 DAI com *B. maydis* (C e D). A barra de escala indica 1 cm em todas as imagens.

Foi detectado um total de 717 proteínas. O gráfico da análise de componentes principais (PCA em dados em pares) forneceu um agrupamento e tendências presentes nos perfis de proteínas nas linhagens L66 e L51 aos quatro e dez dias após a inoculação. Observamos que os tratamentos temporais foram agrupados dentro das duas linhagens, mas as linhagens foram agrupadas em grupos separados, revelando diferenças no fundo genético entre as duas (Figura 2).

A análise proteômica revelou uma gama de proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) nas linhagens de milho pipoca contrastantes sob estresse de *B. maydis*. A linhagem resistente L66 tem um padrão claramente distinto do

genótipo suscetível observado nos sintomas foliares. A análise de PCA também revelou separação basal de DAPs entre as duas linhas, indicando que a resistência a *B. maydis* é intrínseca à linhagem L66.

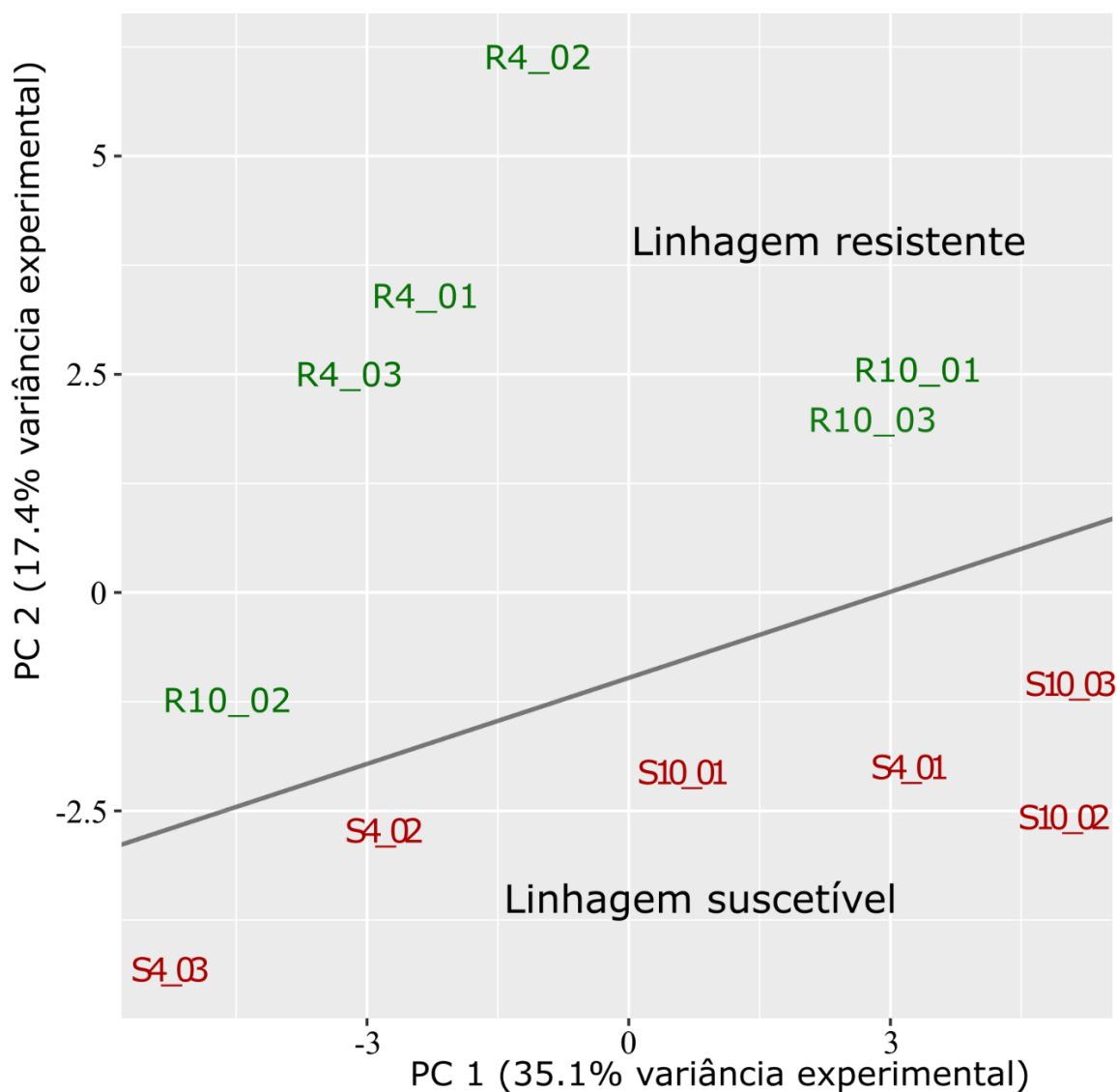


Figura 2. Análise de Componentes Principais (PCA) para redução da dimensionalidade (as proteínas foram consideradas dimensões). As triplicatas da linhagem resistente L66 aos quatro DAI (R4) e dez DAI (R10) foram agrupadas e destacadas em verde. As triplicatas da linhagem suscetível L51 aos quatro DAI (S4) e dez DAI (S10) foram agrupadas e destacadas em vermelho

Na análise proteômica comparativa entre os tempos quatro e 10 DAI para o genótipo resistente L66 (R10/R4), foram identificadas 61 DAPs: 33 down acumuladas e 28 up acumuladas. Por outro lado, na comparação dentro do genótipo susceptível L51 para os tempos 10 e quatro DAI (S10/S4), foram identificadas 80 DAPs: 49 up acumuladas e 31 down acumuladas. Na linhagem resistente L66, cinco proteínas com atividade de peroxidase (POX) foram identificadas em quatro DAI (A0A1D6N0K3 e A0A1D6EAC4) e 10 DAI (A0A1D6GPH0; A0A1D6L6A9 e A0A1D6LYW3). Essas mesmas proteínas POX não mostraram abundância diferencial na linhagem susceptível L51 na comparação S10/S4.

Algumas proteínas prováveis envolvidas na resposta hipersensível (HR) foram diferencialmente acumuladas na linhagem resistente L66. Foram identificadas Natterin-4 (A0A1D6EEW2), Calose sintase (A0A1D6Q188), Quitinases (A0A1D6LMS5 e C0P3M6), proteína 2 de ligação a RNA, rica em glicina (B6STA5) e Actina-7 (A0A1D6E8G3).

Na comparação entre as linhagens resistente e susceptível, no mesmo tempo, foram identificadas 77 DAPs aos quatro DAI (R4/S4) e 56 os dez DAI (R10/S10). Entre essas proteínas, 41 foram up acumuladas na linhagem L66 na comparação R4/S4, mas apenas oito permaneceram up acumuladas na semana seguinte. Por outro lado, das 36 proteínas down acumuladas aos quatro DAI, seis delas mantiveram down acumuladas na comparação R10/S10 (Figura 3). Essas seis proteínas foram proteínas de ligação a RNA ricas em glicina (B6STA5), uma repetição rica em cisteína pertencente à resposta ao estresse salino/família antifúngica (B4FUR2), duas oxidoredutases (K7TWV7 e A0A1D6FUX8), um hidroperóxido de fosfolípido glutathione peroxidase 6 (B4FRF0) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (K7UGF5). Essas seis proteínas estão agrupadas no final do agrupamento VII (Figura 3).

Os receptores de repetição ricos em leucina (NLRs) de ligação a nucleotídeos são receptores de patógenos intracelulares, cujos domínios N-terminais são essenciais para a transdução de sinal após a percepção de uma proteína efetora derivada de patógeno. As duas principais classes de NLRs de plantas são definidas pela presença de um domínio de receptor Toll/interleucina-1

(TIR) ou de bobina espiralada (CC) no terminal N (TNLs e CNLs, respectivamente) (Bentham et al., 2018).

Os genes NLR têm sido descritos em diferentes espécies de plantas pela sua capacidade de gerar transcritos alternativos (Zhang e Gassmann, 2003), sendo o principal meio de resposta da planta ao sistema de estresse contra diversos efetores de patógenos (Dangl e Jones, 2001). Essas proteínas NLR desencadeiam componentes na via de sinalização de defesa da planta (Gassmann et al., 1999; Narusaka et al., 2009). A proteína VIPP1 cloroplástica associada à membrana (B4FVE8), proteína CNL, foi identificada apenas na linhagem resistente L66 aos quatro DAI. Essa proteína CNL é um receptor de reconhecimento de padrões (PRRs), que percebe o padrão molecular associado a patógenos (PAMP) (Gao e Xu, 2009; Bentham et al., 2018; Wróblewski et al., 2018).

Além disso, foram detectadas várias DAPs relacionadas a outro gene TNL (gene RPS4) na rede de interação proteína-proteína (Figura 7). Um gene RPS conferiu resistência de amplo espectro a um patógeno fúngico em plantas de arroz (Li et al., 2019b). Ainda no NLR, foi detectada uma hidrolase da glutationa (A0A1D6E9A2), envolvida em sinais de transdução com vários exemplos de proteínas semelhantes, com especificidade no reconhecimento do patógeno pelas plantas (Bell et al., 2003; Kalunke et al., 2015). Provavelmente as proteínas NLR possam fazer parte do mecanismo de resistência na linhagem L66, levando a uma resposta hipersensível após sinalização da presença do patógeno.

A anotação funcional das DAPs na comparação temporal revela vários processos biológicos em ambos os contrastes (Figura 4). A maioria das DAPs encontradas na comparação R10/R4 estava presente em processos celulares, resposta ao estresse, metabólitos precursores/energia, processo metabólico de carboidratos e fotossíntese. Foram encontrados outros processos interessantes, incluindo organização dos componentes celulares, homeostase, resposta a estímulos endógenos, externos e bióticos. Na comparação dentro da linhagem suscetível L51 (S10/S4), foi observada resposta semelhante, porém a maioria das DAPs foi agrupada como processo biosintético.

As DAPs na comparação R4/S4 foram classificadas em 14 processos biológicos principais (Figura 4). A maioria das DAPs identificadas na comparação R4/S4 estava envolvida em resposta ao estresse, organização de componentes

celulares e várias respostas a estímulos, como estímulo biótico/abiótico e externo/endógeno. O processo biológico da fotossíntese apresentou uma grande quantidade de DAPs nessa comparação. Porém, na comparação R10/S10, esse processo biológico não apresentou muitas DAPs. Na comparação R10/S10, a maioria das DAPs estava envolvida na resposta ao estresse e estímulo.

Na comparação temporal entre os genótipos (R4/S4 e R10/S10), a anotação funcional das DAPs tem respostas semelhantes nos processos que estavam ocorrendo. Na comparação R4/S4, foram identificadas 45 DAPs up acumuladas e 56 DAPs down acumuladas. No entanto, quando vemos o acúmulo diferencial de cada proteína no mapa de calor, notamos poucas proteínas mantendo seu padrão nos dois momentos. Esses resultados indicam que proteínas que mantêm o mesmo nível de abundância em ambas as comparações são uma forte indicação de que sua função é importante para a resistência da linhagem L66.

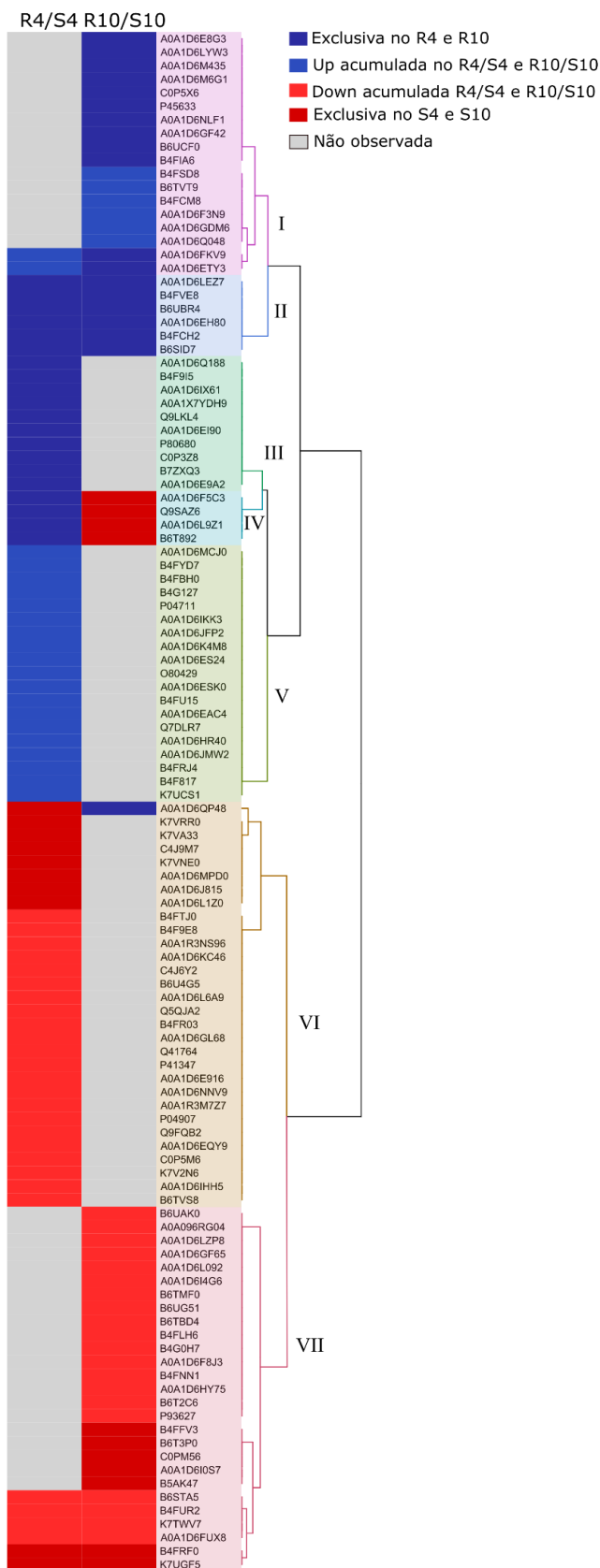


Figura 3. Abundância relativa de proteínas entre a linhagem resistente L66 (R) e a suscetível L51 (S) aos 4 DAI (R4/S4) e dez DAI (R10/S10). Apenas as proteínas diferencialmente acumuladas foram utilizadas para construção do mapa de calor. As proteínas agrupadas exibem tendência de expressão semelhante entre as comparações.

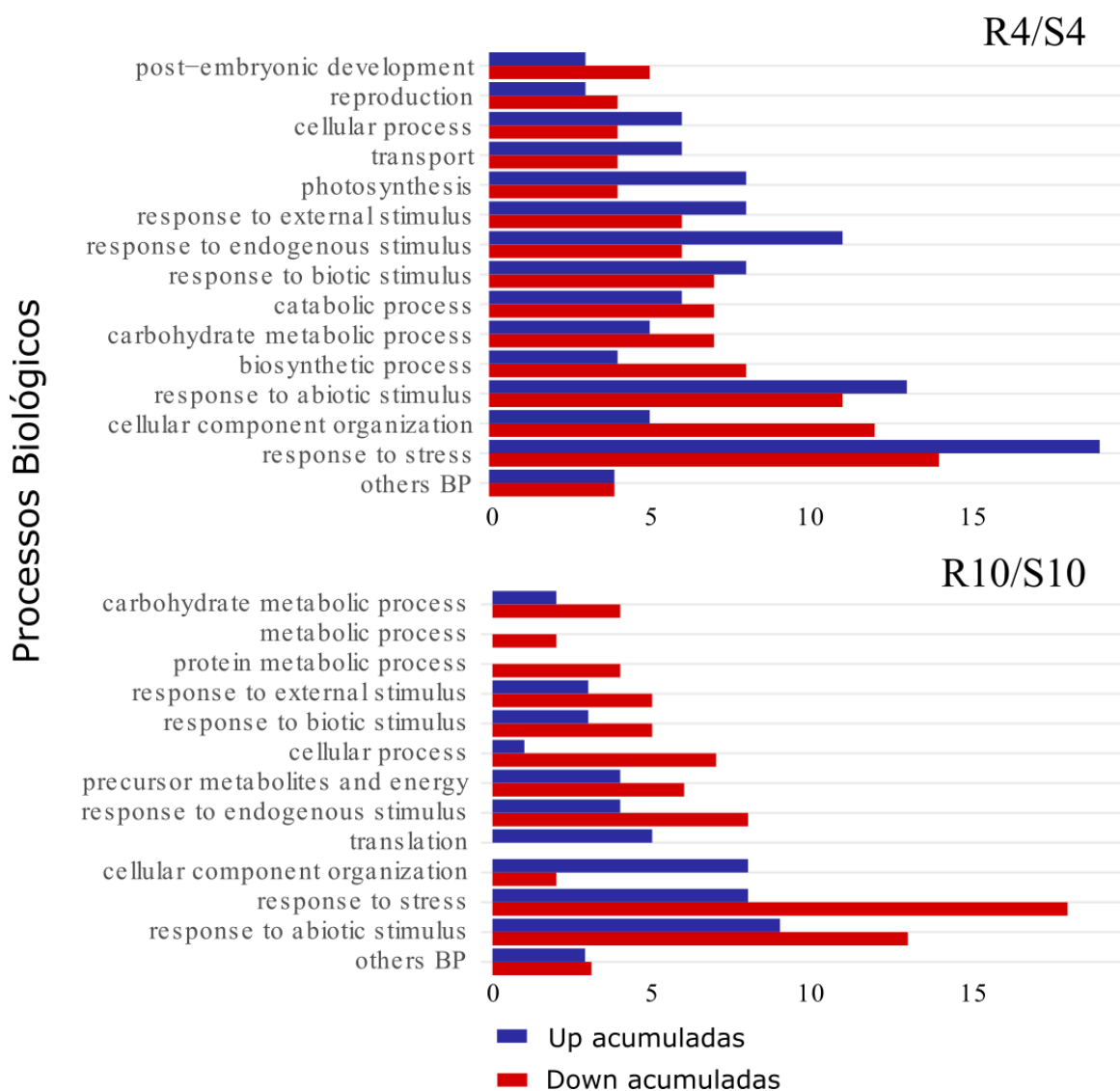


Figura 4. Classificação funcional das proteínas diferencialmente acumuladas entre a linhagem resistente L66 (R) e a linhagem suscetível L51 (S) aos quatro (R4/S4) e dez (R10/S10) dias após a inoculação com *B. maydis*.

No R4/S4, a maioria das DAPs estava associada à resposta ao estresse, mas na comparação do R10/S10, a maioria das DAPs estava down acumuladas na linhagem resistente L66 (Figura 3). Posteriormente, foram feitas interações proteína-proteína das DAPs e comparação entre os genótipos discutidos ao longo do texto. Observou-se que as DAPs da linha resistente L66 apresentaram dois módulos principais, tendo as proteínas PR sido agrupadas nesses módulos. O primeiro módulo contém proteínas presentes nos produtos gênicos do gene RPS4 e o segundo relacionado ao gene DHAR1.

Note-se que os sintomas em resposta à inoculação com *B. maydis* na linhagem resistente L66 foram retardados (Figura 1). Portanto, pode-se pensar que algum processo pode estar ocorrendo simultaneamente nas linhagens em diferentes épocas. Por consequência, a comparação R10/S4 foi verificada para encontrar alguma proteína que constitui o proteoma, mas também relacionada à resposta ao estresse, no mesmo sentido de buscar proteínas sem acúmulo diferencial, mas que poderiam de alguma forma estar envolvidas com o estresse e ser parte das proteínas constitutivas de milho pipoca contra estresse biótico. Assim, foram observadas as proteínas que não apresentaram acúmulo diferencial entre as duas linhagens aos 4 DAI (Figura 5).

Nas duas comparações em R10/S4 e R4/S4, buscando proteínas constitutivas que podem auxiliar na resposta ao estresse, não foi observado um grande número de proteínas diretamente envolvidas com o estresse nos processos biológicos. No entanto, algumas proteínas pontuais identificadas podem participar no auxílio à defesa basal da planta, tais como a ligação do íon cálcio, a atividade da ferroxidase (oxidoredutase), fatores de reconhecimento do patógeno e algumas outras que podem estar formando uma parede celular mais espessa, dificultando a penetração do patógeno, infundido com substâncias fenólicas. Uma análise quantitativa dos transcritos seria recomendada para avaliar se um genótipo tem algum padrão alterado, independentemente da presença do patógeno.

As proteínas que alteraram seu acúmulo diferencial aos quatro e dez DAI na linhagem resistente L66 também podem desempenhar papel importante, provavelmente iniciando uma via de sinalização de resposta a patógenos da planta, sendo proteínas abundantes no início da resposta ao patógeno. Por exemplo, os processos biológicos de resposta ao estímulo apresentaram a maioria das proteínas up acumuladas na comparação R10/R4, já na comparação S10/S4, esses processos apresentaram mais proteínas down acumuladas (Figura 6).

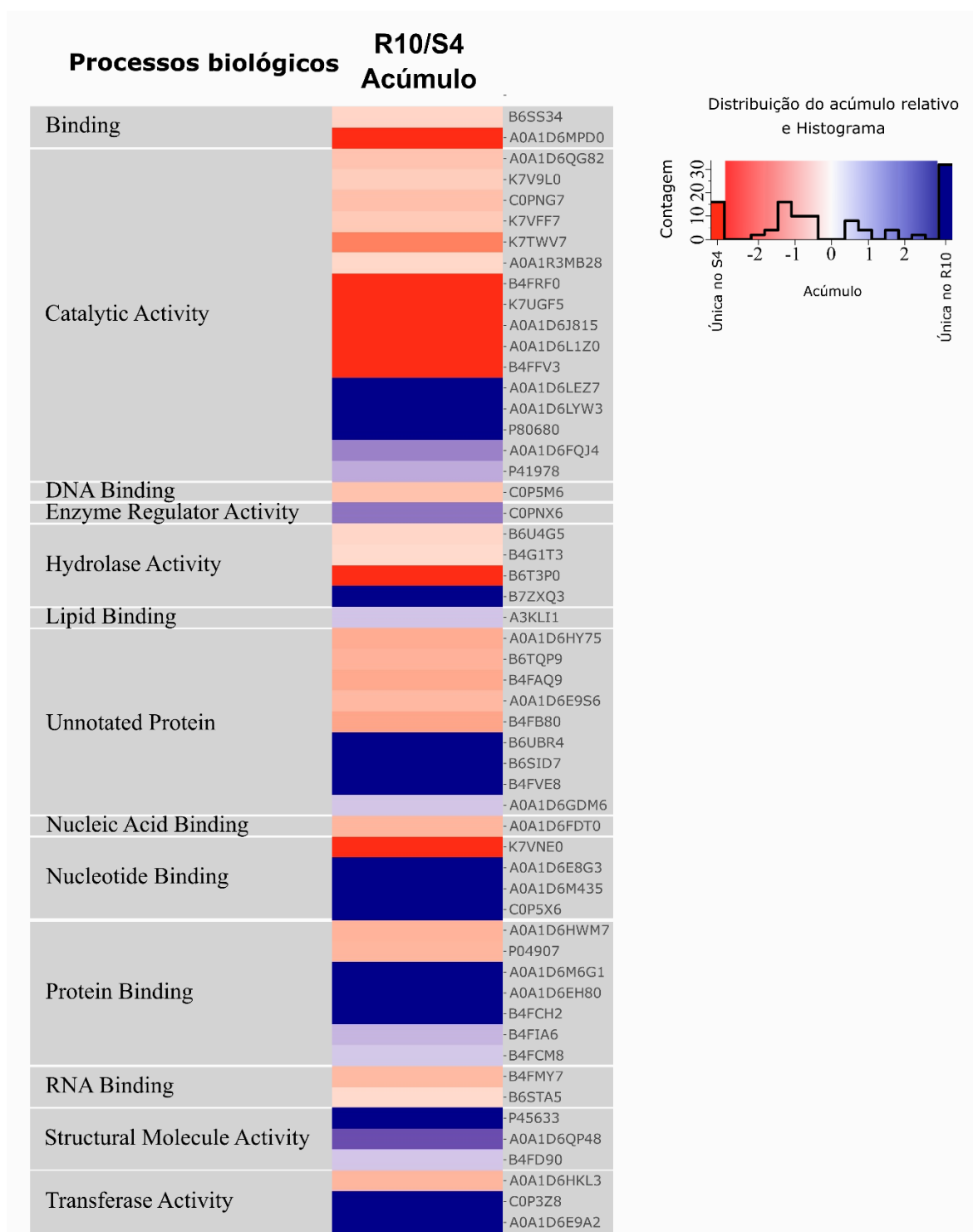


Figura 5. Abundância relativa de proteínas entre a linhagem resistente L66 aos dez DAI (R10) e a L51 suscetível aos quatro DAI (S4). Foram usadas no mapa de calor apenas as proteínas diferencialmente acumuladas. As proteínas foram agrupadas pelo seu processo biológico após anotação funcional.

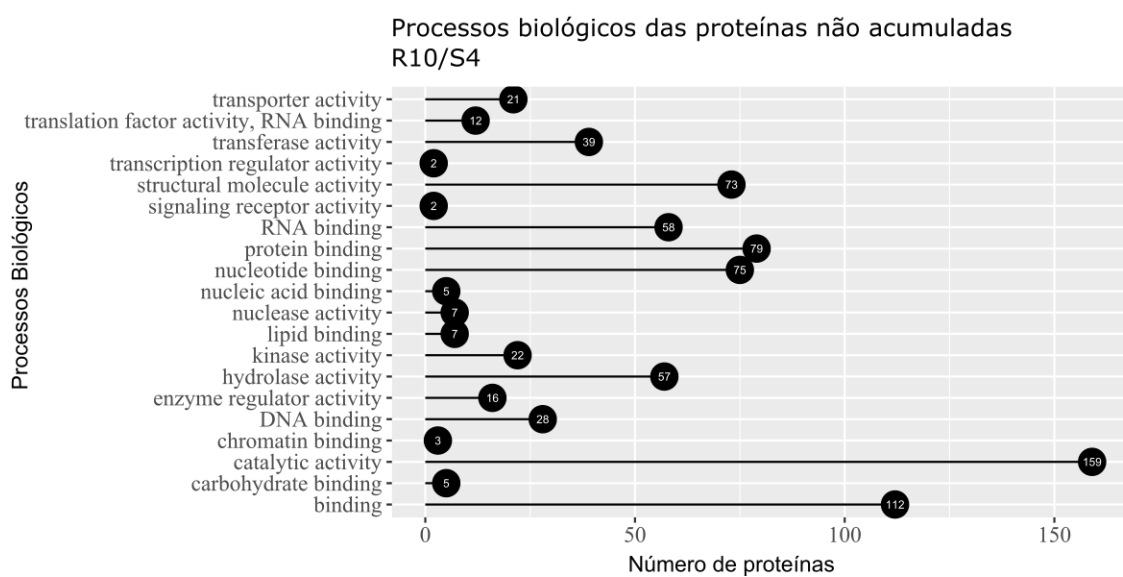
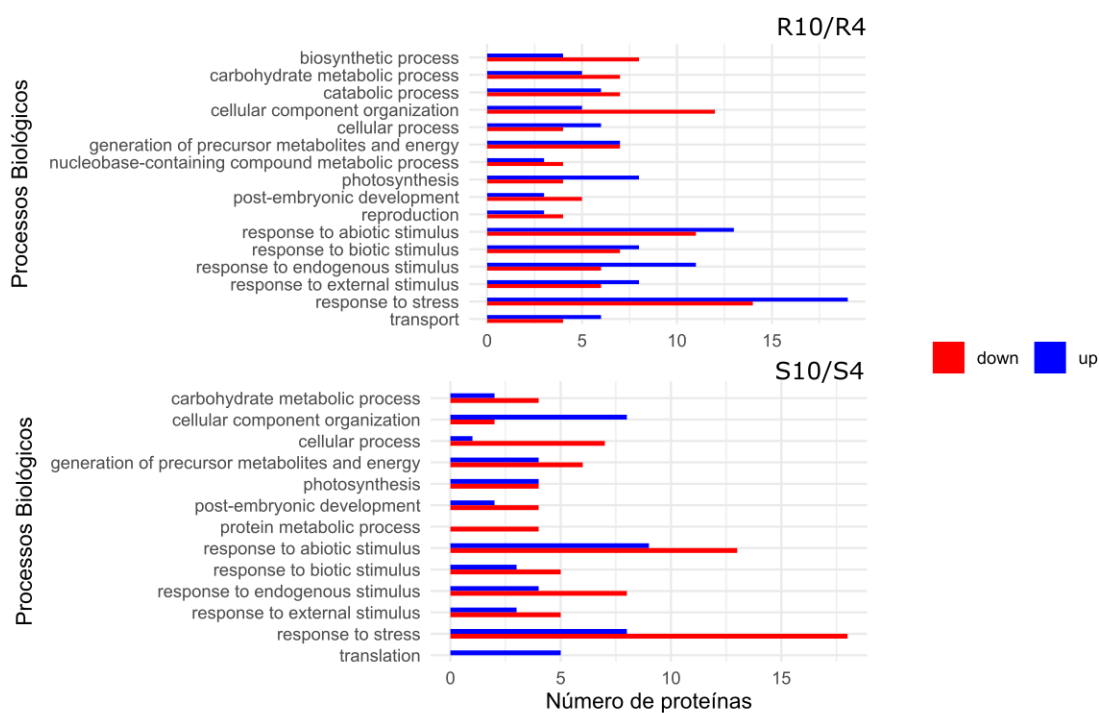


Figura 6. Classificação funcional das proteínas diferencialmente acumuladas entre a linhagem resistente L66 (R) no tempo 4 DAI e dez DAI (R4/R10) e a linhagem suscetível L51 (S) aos 4 DAI e dez DAI (S10/S4). Abaixo, proteínas não acumuladas diferencialmente na comparação entre a linhagem resistente L66 aos dez DAI e a linhagem suscetível L51 aos 4 DAI (R10/S4) após a inoculação com *B. maydis*.

RPS4 gene



Figura 7. Rede proteína-proteína do primeiro módulo, considerando as proteínas diferencialmente acumuladas detectadas quatro e dez dias após a inoculação com *Bipolaris maydis* na linhagem resistente L66 de milho pipoca (R10/R4).

Numa análise de interação proteína-proteína, uma VPP1 tem uma co-expressão com ferredoxinas. Detectamos ferredoxinas down acumuladas (O80429 e B1P758) na comparação R10/R4, mas com maior acúmulo na comparação R4/S4. As ferredoxinas podem ser restituições dos cloroplastos ao núcleo em um transporte de sinais de imunidade (Wang et al., 2018). A SAR descrita como o pilar da resistência das plantas aos patógenos tem pontos de partida para a via de

sinalização na resposta de defesa das plantas em cloroplastos através das ferredoxinas (Caplan et al., 2015; Ab Rahman et al., 2018), e isso pode ser caracterizado como o início da imunidade na linhagem resistente L66 desencadeada por PAMP.

As ferredoxinas também têm uma relação indireta com o ácido salicílico (SA). Em um mutante de *Arabidopsis* com gene de ferredoxina silenciado, o excesso de transferência de elétrons gerado pelo PSI foi para moléculas de O₂. Isso leva ao superóxido acumulado, que também pode causar peroxidação lipídica (Wang et al., 2018). Hormônios do tipo oxilipina são precursores do ácido jasmônico (Wasternack e Hause, 2013), e sua presença é antagônica à SA (Bari e Jones, 2009). Com base nisso, a presença de DAPs com função de ferredoxinas e SA pode estar relacionada a um padrão de resposta ao estresse biótico.

As proteínas relacionadas à via da SA desempenham papel na imunidade desencadeada por efetores, associada à resposta hipersensível, principalmente contra patógenos biotróficos (Slaymaker et al., 2002; Vlot et al., 2009). Foi detectada uma proteína calose sintase 7 (A0A1D6Q188) apenas na linhagem resistente L66 aos quatro DAI. Essa proteína tem alta similaridade com proteínas da calose sintase em *A. thaliana* envolvidas na via SA com deposição de calose na parede celular (Vogel e Somerville, 2000; Nishimura et al., 2003; Hok et al., 2010).

Nas plantas, o SA também atua regulando os mecanismos locais de resistência a doenças, incluindo morte celular do hospedeiro, modificações na parede celular e expressão gênica (Bartsch et al., 2006). Essa regulação tenta isolar regiões infectadas para conter a evolução da colonização de patógenos através dos tecidos das folhas (Bartsch et al., 2006). Associado a esta resposta de contenção, foi identificado um Natterin-4 (A0A1D6EEW2) na linhagem resistente L66 com menor acúmulo na comparação R10/R4. Essa proteína pertence à família das cisteínas proteinases e está envolvida em eventos fisiológicos como germinação, senescência e respostas ao estresse ambiental, com morte celular programada (Andrade et al., 2011). Ambas as proteínas podem estar envolvidas com resposta hipersensível, na tentativa de limitar a colonização por *B. maydis* em células adjacentes na linhagem resistente L66 no início da infecção. Com base nisso, acreditamos que a regulação da via SA possa ser parte de um dos mecanismos que conferem resistência à linhagem L66.

Após a interação planta-patógeno e a percepção da planta, uma estratégia dos patógenos provavelmente é a inativação de alguns genes relacionados à sinalização após a infecção (Ishiga et al., 2016). O fungo pode ter como alvo a homeostase das espécies reativas de oxigênio dos cloroplastos (ROS), causando maior acúmulo de ROS. Em tomates e *Arabidopsis*, após silenciar os genes relacionados à desintoxicação de ROS, foi observado esse acúmulo de ROS, resultando em rápida progressão dos sintomas de morte celular relacionada à doença localizada. Assim, o sucesso do mecanismo de resistência da planta dependerá da ativação transcricional das moléculas de sinalização de defesa restante inativada pelo patógeno (Ishiga et al., 2009; Ishiga et al., 2012).

Entre essas moléculas de sinalização de defesa, incluindo ROS, os cloroplastos também são responsáveis pela biossíntese de vários fito-hormônios relacionados à imunidade vegetal, como JA e SA (Rolland et al., 2012; Seyfferth e Tsuda, 2014; Serrano et al., 2016). As proteínas pertencentes à via SA detectada colaboram para que as ferredoxinas desempenhem papel positivo na acumulação de ROS mediada por PTI, concomitantemente regulando a síntese de calose durante o fechamento dos estômatos e durante a resposta das plantas à desidratação e a alguns elicitores de fungos (Kwak et al., 2006). Um mutante de *Arabidopsis* com o gene da ferredoxina silenciado exibiu acúmulo reduzido de ROS induzida por PTI (Wang et al., 2018). Nossos resultados confirmam este achado, mostrando um amplo acúmulo de DAPs relacionadas à ROS principalmente em quatro DAI. Muitas dessas DAPs estavam relacionadas à via do gene DHAR1 na anotação funcional da interação proteína-proteína (Figura 8). As proteínas DHAR estão envolvidas na eliminação de ROS sob reações de defesa antioxidante em plantas (Chew et al., 2003).

A superóxido dismutase (SOD) é uma das principais proteínas nos processos de neutralização de ROS nas células vegetais, desempenhando papel diretamente na resistência das plantas a um grande número de patógenos (Mittler, 2002; Bindschedler et al., 2006). Entre as proteínas relacionadas a ROS, foi identificada uma SOD [Mn] 3.2 (P41978) apenas na linhagem resistente L66 quatro vezes mais acumulada aos 10 DAI de que aos quatro DAI. Encontramos diferentes proteínas relacionadas com ROS atuando em quatro DAI e 10 DAI na linhagem resistente L66. Por exemplo, uma peroxidase ligada à membrana plasmática (B4FBH0), proteína fasciclina arabinogalactana (A0A1D6ES24), lipoxigenase

(LOX2: Q9LKL4), chaperona (A0A1D6MCJ0) e polifenol oxidase do cloroplasto (A0A1X7YD9). O acúmulo dessas proteínas provavelmente previne a morte generalizada do tecido causada pelo acúmulo de ROS (Montillet et al., 2005). A intensidade da resposta de defesa aos elicitores produzidos por patógenos pode ser responsável pela caracterização da resistência ou suscetibilidade entre os genótipos (Van Loon et al., 2006). Acreditamos que o acúmulo diferencial dessas várias proteínas relacionadas a ROS possa ser explicado pela via eficiente de sinalização e resposta rápida a *B. maydis* na linhagem resistente L66.

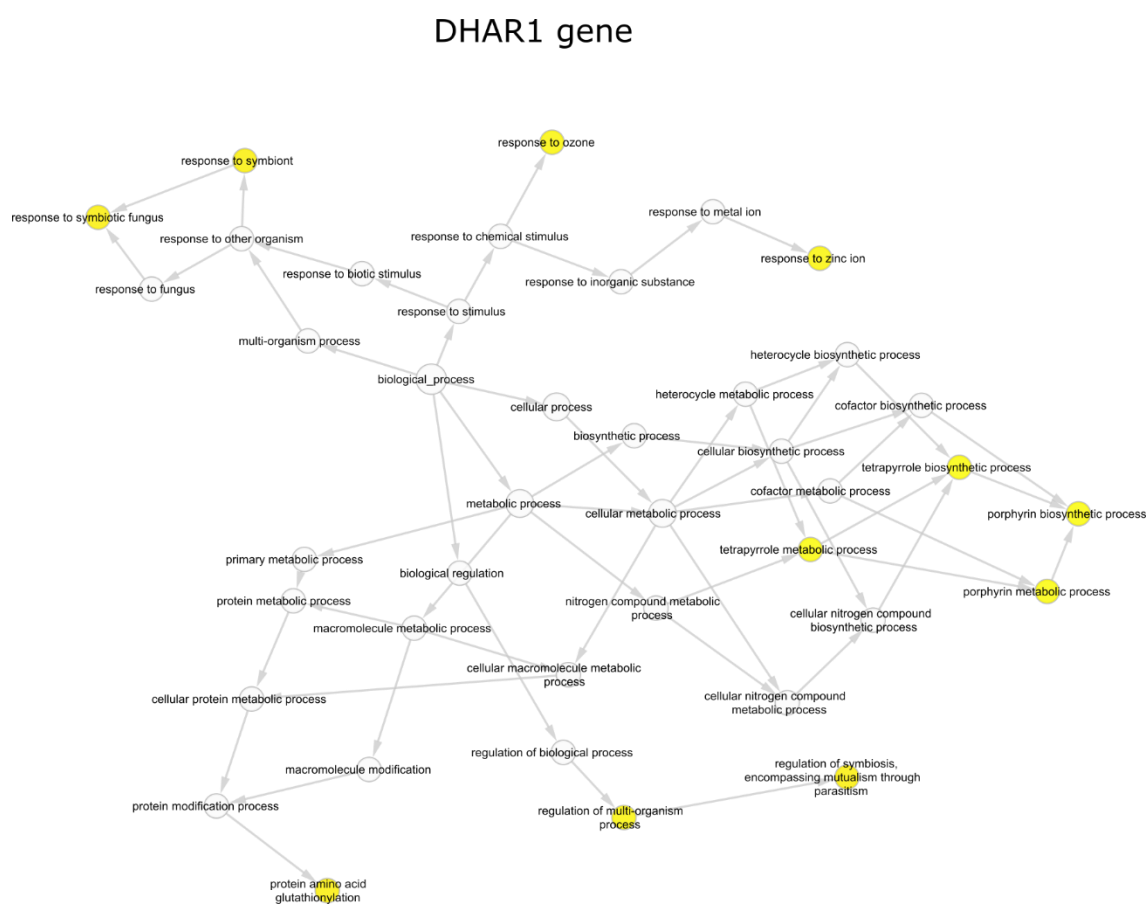


Figura 8. Rede proteína-proteína do segundo módulo, considerando as proteínas diferenciais acumuladas, detectadas quatro e dez dias após a inoculação com *Bipolaris maydis* na linhagem resistente L66 de milho pipoca (R10/R4).

Foram encontradas outras DAPs importantes relacionadas ao estresse, como proteínas abundantes na embriogênese tardia - LEA (B6SID7), que permaneceram com maior acúmulo tanto aos quatro (R4/S4) e dez dias (R10/S10) após a inoculação com *B. maydis* na linhagem L66. As proteínas LEA mostraram atividade antifúngica eficiente contra vários outros fungos, como *Botrytis cinerea*, *Mycosphaerella arachidis*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* (Yan et al., 2015).

No milho, duas proteínas LEA foram propostas como um possível marcador de resistência ao fungo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Chen et al., 2002). Após a infecção por fungo, o citoplasma se desidrata em torno do local da infecção, provocado por ROS e deposição de calos na resposta hipersensível da planta ao detectar alguns elicitores de fungos e limitar o crescimento do fungo (Storme e Geelen, 2014). As proteínas LEA podem contribuir para a formação de uma rede de pontes de hidrogênio para promover a estabilidade a longo prazo dos açúcares em tecidos próximos ao estresse por desidratação (Wolkers et al., 2001). Além disso, as proteínas LEA aumentaram a tolerância do tabaco transgênico ao estresse oxidativo (Liu et al., 2017b 2019), ligando-se a metais livres, uma atividade que pode aliviar os danos oxidativos, impedindo a formação de ROS tóxicas (Liu et al., 2017a). A proteína LEA encontrada na linhagem resistente L66 pode estar relacionada às funções de manutenção próximo aos locais de infecção.

Outras proteínas foram detectadas apenas na linhagem resistente L66 em ambas as comparações. Uma proteína não caracterizada (B6UBR4) tem domínio semelhante a uma Jacalin-like lectina por similaridade nas anotações funcionais. Essa proteína está relacionada à ativação da resposta de defesa ao estresse, iniciando cascatas de sinalização (Vandenborre et al., 2011; Xiang et al., 2011; Esch e Schaffrath, 2017), envolvidas na mediação da resistência a doenças de amplo espectro em plantas monocotiledôneas (Weidenbach et al., 2016). A Jacalin-like lectina provavelmente foi responsável por realocar proteínas para o local do ataque de patógenos, provavelmente pela ligação a assinaturas de oligossacarídeos típicas do processo de infecção (Weidenbach et al., 2016). Acredita-se que essa proteína faça parte da imunidade desencadeada por PAMP da linhagem resistente L66.

Ainda no genótipo resistente, identificamos uma histona H3 (B4FCH2), descrita em *Arabidopsis* como reguladora de um subconjunto de genes dentro da via de sinalização de JA e/ou etileno da SAR contra patógenos fúngicos (Berr et al., 2010). Além disso, as histonas podem ativar reguladores negativos de PTI, que são induzidos pela via SA (Kim et al., 2008). Como as vias de JA e SA são antagônicas, acreditamos que essa histona possa estar atuando em torno da infecção, diminuindo os potenciais efeitos nocivos da própria resposta da planta.

A resposta efetiva da planta ao patógeno depende da comunicação ativa dos sinais do cloroplasto com outras organelas, sendo necessária para a integração de múltiplos estímulos ambientais. A manutenção deste aparelho é de grande importância (Serrano et al., 2016), porque a base de resistência pode exigir não apenas a presença de altos níveis de proteínas antifúngicas, mas também o funcionamento regular para essas proteínas agirem (Chen et al., 2004). Identificamos várias DAPs envolvidas na manutenção do aparato fotossintético na linhagem resistente L66, principalmente aos quatro DAI.

Entre essas DAPs, uma triosefosfato isomerase (A0A1D6ETY3), fosfoenolpiruvato carboxilase (P04711), centro de reação do fotossistema I (K7UCS1), proteína de ligação à clorofila a-b (B6T892) e fosfoenolpiruvato carboxilase (Q9SAZ6). Também foi identificada uma proteína de reparo do fotossistema II com maior acúmulo (B4FRJ4) apenas aos quatro DAI.

Um mutante de *Arabidopsis*, que não expressa a proteína do lúmen do tilacóide, apresentou uma repressão imperfeita dos transcritos relacionados à defesa, após o crescimento sob diferentes comprimentos de ondas de luz, possivelmente por sinais originados de mau funcionamento do ciclo de reparo do fotossistema II (PSII) (Järvi et al., 2016). Acredita-se que direta ou indiretamente essas proteínas relacionadas à fotossíntese possam modular a abundância de transcritos dos genes de resposta após a infecção por *B. maydis* na linhagem resistente L66

3.1.5. CONCLUSÃO

Identificamos novos componentes envolvidos na resposta à infecção por *Bipolaris maydis* em milho pipoca. A linhagem resistente L66 apresentou várias proteínas envolvidas no metabolismo da fotossíntese, resposta ao estresse, resposta ao estímulo, manutenção celular e processo de desintoxicação que, juntos, podem ser eficazes na construção de um sistema contra a infecção por fungos. As proteínas de repetição ricas em leucina relacionadas ao ácido salicílico e ligadas aos nucleotídeos podem ser responsáveis por iniciar uma resposta ao fungo na linhagem resistente L66. Esta resposta se concentra na neutralização de espécies reativas de oxigênio e na contenção de fungos por deposição de calos. O cloroplasto é a principal organela envolvida na percepção do fungo para iniciar uma resposta de sinalização, sendo sua manutenção essencial.

A análise proteômica permitiu destacar possíveis candidatos a biomarcadores de SLB para milho pipoca, incluindo as proteínas relacionadas ao NLR detectadas na linhagem resistente L66 (A0A1D6E9A2; B4FVE8; O22424 e P02355: ambos os genes RPS4), algumas DAPs relacionadas ao SA (A0A1D6Q188 e A0A1D6EEW2) e DAPs relacionadas a ROS (B4F817). A proteína LEA (B6SID7), a jacalin-like lectina (B6UBR4; Q9M5W9 gene MBP2) e as DAPs relacionadas à fotossíntese (B4FRJ4) são potenciais candidatas a marcadores moleculares.

3.2. ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA EM DIFERENTES CULTIVARES DE SOJA SOB ESTRESSE SALINO

3.2.1. INTRODUÇÃO

O dogma central do melhorista de plantas é a desafiadora tarefa de aumentar a produção de diversas culturas e de recursos alimentares, tendo por motivação a crescente demanda populacional. Essa tarefa precisa ainda ser cumprida frente às mudanças climáticas e a vários estresses bióticos e abióticos que tornam ainda maiores o desafio do crescimento e a produção de culturas agrícolas. Entre os estresses abióticos, a salinidade é considerada um dos principais fatores limitantes do crescimento e da produção de culturas agrícolas em todo o mundo, principalmente nas regiões áridas e semiáridas em razão de sua grande ocorrência e da dificuldade de controle (Kashyap et al., 2018).

As perdas anuais globais projetadas em razão do estresse salino somente em áreas irrigadas ultrapassam os US\$27,3 bilhões somente pela perda de produção da safra (Qadir et al., 2014). Esses dados alarmantes ainda não consideram os recentes estudos publicados que apontam que aproximadamente 40% dos solos de todo o planeta passam por estresse hídrico e se correlacionam fortemente com o estresse salino (Huang et al., 2015).

O estresse salino está frequentemente associado com o estresse hídrico em regiões com baixa precipitação e também em locais irrigados com manejo

inadequado (Daoud et al., 2018). Cerca de 30% das áreas destinadas ao cultivo e irrigadas ao redor do mundo estão afetadas pela salinidade, com previsão de aumento para 50% nos próximos 30 anos (Soda et al., 2016; Machado e Serralheiro, 2017).

O estresse salino ocorre quando a concentração de diferentes íons (sobretudo o NaCl) no solo aumenta até interferir no desenvolvimento normal da planta. Assim, culturas melhoradas com tolerância ao estresse salino são necessárias, principalmente culturas de impacto mundial como a soja (*Glycine max* L.). A soja é cultivada em todo o mundo e amplamente adaptada a diversas condições, tendo desempenho muito reduzido sob condição de estresse salino (Phang et al., 2008; Roy et al., 2014).

As respostas das plantas ao estresse salino são complexas e levam a rotas metabólicas complexas com genes específicos expressos na condição de estresse. Esse fenômeno envolve duas ideias principais: nas primeiras horas, ocorre a ativação de resposta íon-dependente relacionada com o Na⁺ e suas vias de sinalização nas plantas, causando fechamento dos estômatos e inibição da expansão foliar (Munns e Termaat, 1986; Gilroy et al., 2014; Roy et al., 2014). Com o prolongamento do estresse em dias ou semanas, há um acúmulo excessivo de íons até atingirem níveis tóxicos. Nessa segunda fase, começam a ser observados sintomas como rendimento reduzido, lesões de queimaduras (murcha seguida de clorose e necrose da borda para o centro das folhas), senescência prematura principalmente nas folhas mais velhas e até mesmo a morte da planta (Munns e Tester, 2008).

Para explicar essas respostas, há algumas hipóteses como os mecanismos de exclusão de íons na parte aérea das plantas e a inibição de íons tóxicos pela alocação em organelas e tecidos específicos (Munns e Tester, 2008; Byrt et al., 2014). Um dos principais processos sugeridos envolvidos na resposta da planta sob estresse salino é a manutenção da água na planta, a transpiração e sua eficiência (Harris et al., 2010; This et al., 2010; Barbieri et al., 2012). Por exemplo, o gene HaHB11 conferiu resistência a estresses abióticos quando introduzido em plantas transgênicas de *A. thaliana*. As plantas transformadas apresentaram melhor desempenho do que plantas silvestres, por promoverem um fechamento estomático mais rápido e o alongamento das raízes (Shinozaki e Yamaguchi-

Shinozaki, 1997). A área foliar também é pertinente para melhorar a tolerância das plantas (Maggio et al., 2007), bem como a germinação das sementes e vias envolvidas com o vigor da planta (Kingsbury e Epstein, 1984; Foolad e Lin, 1997; Gholizadeh et al., 2014). Há também uma resposta íon-independente, em que a manutenção do desenvolvimento e o crescimento junto à absorção de água não são afetados pela concentração de Na^+ na parte aérea (Munns e Tester, 2008).

Grandes avanços foram obtidos com o conhecimento de variáveis envolvidas com o estresse salino, contudo, elucidar quais vias podem estar envolvidas a nível molecular fornecerá informações importantes para a engenharia genética na cultura da soja. Algumas informações relacionadas a genes estão disponíveis, como QTLs identificados por mapas de ligação e associação para estresse salino em soja durante a germinação (Qiu et al.; Zhang et al.; Kan et al.; Kan et al.) e identificação de um importante locus relatado por diversos grupos como ligado à resposta ao estresse salino na soja (Guan et al., 2014). Outros trabalhos verificaram as respostas da soja com presença e ausência do gene, alterando a concentração de Cl^- e Na^+ principalmente nas raízes e folhas das plantas de soja (Liu et al., 2016). Mas ainda há pouca informação para o produto final dos genes, as proteínas, e como o perfil proteico de um genótipo atua para permitir resistência sob condições de estresse.

O objetivo deste trabalho foi investigar proteínas diferencialmente acumuladas envolvidas com as vias de resposta contra o estresse salino em dois genótipos contrastantes de soja (um resistente e outro suscetível), submetidos à irrigação com solução contendo 120 mM de NaCl. Foram apresentadas novas informações com análise proteômica de soja sob estresse salino com a identificação de proteínas diferencialmente acumuladas, associadas ao mecanismo de resistência a esse estresse, que ampliará o conhecimento para futuras pesquisas em melhoramento de plantas.

3.2.2. REVISÃO

3.2.2.1. Estratégias moleculares para melhoramento de soja sob estresse salino

O estresse salino é considerado um dos fatores mais relevantes e limitantes à produção agrícola mundial, principalmente em regiões áridas e semiáridas em razão das condições edafoclimáticas destas regiões (Munns, 2011). Estima-se que mais de 20% das terras cultivadas em todo o mundo sejam afetadas por sais e que este valor seja crescente (Gupta e Huang, 2014). No Brasil, o problema de salinização dos solos é mais marcante no período das secas, com cerca de 160.000 km² ou 2% de todo o território nacional comprometido por sais (Melo e Alleoni, 2009).

Os solos afetados por sais são aqueles adversamente modificados para o crescimento da maioria das espécies pela presença de sais solúveis, sódio trocável ou ambos. Os sólidos solúveis consistem normalmente, de várias proporções dos cátions Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, dos ânions Cl⁻, SO₄²⁺, HCO₃⁻ e, às vezes, de K⁺, CO₃²⁻ e NO₃⁻. Esses solos comuns estão presentes nas regiões áridas e semiáridas em razão da baixa precipitação e da alta taxa de evaporação. Por isso, os sais não são lixiviados, acumulando-se em quantidades prejudiciais ao crescimento normal das plantas. A salinização também ocorre em regiões do litoral, em consequência da inundação do solo pela água salgada dos mares (Santos et al., 2013).

Existem duas maneiras de minimizar os problemas decorrentes da salinidade. A primeira é melhorar as condições do solo para favorecer o desenvolvimento das plantas, o que implica atividades onerosas e complexas pela pontualidade, a segunda é desenvolver novas cultivares melhoradas às condições, com o objetivo de melhorar sua adaptação ao ambiente sob estresse, apresentando resistência.

Para melhorar a resistência ao estresse da soja sob adversidades dos estresses abióticos, esforços acelerados foram empreendidos nas últimas décadas. No entanto, questões como acentuação dos estresses e mudanças climáticas incertas causaram grandes barreiras para os melhoristas desenvolverem melhores cultivares de soja (Lateef, 2015). Para combater essas dificuldades, faz-se

necessário utilizar novas tecnologias, incluindo a seleção assistida por marcadores (SAM), para melhorar o rendimento da soja sob estresse. SAM fornece uma oportunidade para selecionar plantas resistentes ao estresse com precisão, nos programas de melhoramento (Kiriga et al., 2016). Contudo a principal etapa desse processo é a identificação de biomarcadores ligados à resistência.

O desenvolvimento de uma nova cultivar de soja pode seguir um exemplo utilizado para arroz, outra planta autógama. Hossain et al. (2015) fizeram o mapeamento de QTL em uma população F2 derivada de um cruzamento de 'Cheriviruppu' resistente à salinidade com a cultivar sensível 'Pusa Basmati 1' (PB1), usando 131 marcadores SSR, e mapeou 16 QTLs para diferentes características como fertilidade do pólen, concentração de Na⁺ e Na/K proporção nos cromossomos 1, 7, 8 e 10. Assim, esses QTLs estavam associados a várias características relacionadas à tolerância à salinidade, como concentração de potássio nas plântulas, razão sódio/potássio, escore de lesão por sal, altura da planta e brotação. Já Leon et al. (2016) avaliaram a massa seca em linhagens recombinantes obtidas de um cruzamento de 'Bengala' com 'Pokkali'. Um total de 85 QTLs aditivos foram mapeados através de 9303 SNPs nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11 e 12. Esses QTLs para tolerância à salinidade podem ser efetivamente utilizados em programas de melhoramento de arroz, tendo como base em melhoramento assistido por marcadores para tolerância à salinidade.

O que ambos os métodos têm em comum é a identificação de genótipos com resistência e a identificação de marcas associadas à resistência nos genótipos. Com a disponibilidade das sequências do genoma das espécies mais cultivadas como a soja, tornou-se possível fazer associações entre o desempenho fisiológico e os mecanismos biológicos subjacentes envolvidos no estresse de salinidade. Os recentes avanços em pesquisa e tecnologia podem desempenhar papel crítico no desenvolvimento de novas cultivares resistentes ao sal, vigorosas e de alto rendimento.

Uma análise proteômica nesse sentido também desempenharia um papel semelhante na identificação de marcas, com a vantagem de que o perfil proteico estaria mostrando o que realmente foi expresso relacionado à resistência, e marcas baseadas apenas na sequência genética podem na verdade não estar sendo expressas, ou sofrer alguma modificação epigenética. Este trabalho utiliza a

ferramenta da proteômica para buscar biomarcadores em soja para o estresse salino, participando de uma das etapas mais importantes, a identificação de genótipos e genes de resistência.

3.2.2.2. Mecanismos de defesa contra estresse salino em soja

As plantas sésseis precisam enfrentar muitos estresses ambientais e desenvolver mecanismos fisiológicos e bioquímicos para resistir a esses estresses. A salinidade é um dos principais estresses que afetam o crescimento da planta e impõe impacto direto na produtividade e no rendimento (Qadir et al., 2014). Esse estresse afeta vários mecanismos fisiológicos e bioquímicos nas plantas, incluindo germinação e crescimento, fotossíntese e relações hídricas das plantas. As plantas, quando expostas a tensões externas, desenvolvem mecanismos e respostas para se defender. Assim, a tolerância ao sal é regulada por uma rede complexa de diferentes características de componentes (Golldack et al., 2014). Os mecanismos de resistência da planta para se proteger geralmente envolvem exclusão de íons das raízes, sequestro de íons em vacúolo e alta tolerância à toxicidade de íons (Gosal e Wani, 2018).

O estresse salino afeta negativamente o crescimento e o desenvolvimento, inibindo muitos processos metabólicos e a expansão celular, desencadeando a morte celular programada (Huh et al., 2002). Durante as fases iniciais do estresse por salinidade, o estresse osmótico é predominante, levando ao aumento da transpiração e à perda da capacidade de absorção das raízes (Munns e Tester, 2008). O estresse osmótico é acompanhado por várias alterações bioquímicas e fisiológicas, incluindo desintegração de membranas, desequilíbrio de íons nas células, diminuição da atividade fotossintética e condutância estomática reduzida (Gupta e Huang, 2014).

Em resposta ao estresse osmótico, as plantas ajustam a pressão osmótica dentro das células, o que normalmente acontece nas primeiras horas após o estresse. Gradualmente, as concentrações de Na^+ e Cl^- aumentam dentro do citoplasma celular, resultando em estresse iônico (Munns e Tester, 2008). Embora o estresse iônico se desenvolva gradualmente, pois leva tempo para a concentração de Na^+ e/ou Cl^- atingir os níveis tóxicos, ele se torna muito mais importante quando comparado ao estresse osmótico. A alta concentração de Na^+

não apenas causa desequilíbrio de íons, mas também interfere na absorção de K^+ pelas raízes, levando à deficiência de K^+ , o que resulta em menor produtividade (James et al., 2011).

A maioria dos estudos de salinidade feitos em plantas não diferencia entre estresse e choque salino. A exposição da planta a uma única aplicação de alta concentração de sal leva à plasmólise, resultando em um choque osmótico. A planta tenta lidar com o choque osmótico, mantendo a homeostase do íon. No entanto, a concentração excessiva de sal nas células radiculares causa vazamento da solução salina no espaço apoplástico, que viaja rapidamente para os brotos, sem muito controle ou regulação. Esse processo leva ao estresse iônico precoce nas brotações, causando sobreposição entre a expressão gênica relacionada às fases osmótica e iônica (Shavrukov, 2012).

Esses experimentos de choque salino identificam muito poucos genes associados à fase iônica. Por outro lado, o aumento gradual nas concentrações de sal resulta em estresse salino, não ocorrendo muita sobreposição entre respostas osmóticas e iônicas, sendo esses experimentos capazes de identificar um grande número de genes associados ao estresse iônico (Shavrukov, 2012). Em resposta ao choque salino, vários genes envolvidos na manutenção do turgor celular, acúmulo de osmólitos e balanço hídrico são induzidos nas primeiras horas do tratamento com sal (Kawasaki et al., 2001).

Vários outros genes envolvidos em funções relacionadas à defesa são regulados positivamente nas primeiras 24 horas, provavelmente pela restauração de componentes danificados da célula em razão do choque osmótico (Kawasaki et al., 2001). No entanto, os genes envolvidos na resposta iônica são induzidos somente após uma semana de tratamento com sal. Nesses estudos de choque salino, muitos genes importantes como transportadores de íons não foram regulados, sugerindo que o choque osmótico pode alterar o padrão de expressão de alguns genes relacionados ao estresse, o que pode levar a uma inferência incorreta (Shavrukov, 2012).

Por exemplo, a comparação da expressão de quatro genes da superóxido dismutase (SOD) na aplicação em uma etapa e na aplicação por etapas de NaCl revelou que os quatro genes estavam altamente regulados em relação ao controle na aplicação inicial do estresse salino; contudo, com o aumento gradual da

concentração de NaCl, nenhum dos quatro genes apresentou acúmulo diferencial quando comparado ao controle (Rubio et al., 2009). Essas observações sugeriram que esses genes SOD podem estar envolvidos no choque osmótico, não no estresse do sal.

Em condições de campo, o choque osmótico quase nunca acontece, pois solos com excesso de sais permanecem nessa condição até que seja feito um manejo corretivo. Para compreender o complexo sistema de resistência à salinidade, é importante entender os determinantes genéticos que regulam as respostas bioquímicas e fisiológicas e utilizá-los para o desenvolvimento de novas cultivares resistentes à salinidade. Este trabalho teve como objetivo encontrar e estudar proteínas diferencialmente acumuladas, associadas à resistência ao estresse salino em soja, e fornecer possíveis candidatos a biomarcadores para serem utilizados em programas de melhoramento.

3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1. Material vegetal e condições

Sementes de soja (*Glycine max* L.) foram cedidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Soja da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Sete genótipos foram pré-selecionados através de experimentos dentro do programa (dados não publicados) entre genótipos potencialmente resistentes e suscetíveis ao estresse salino. Foi feita uma triagem entre os genótipos, selecionados dois genótipos com resposta fenotípica distinta e identificados o genótipo 771 como resistente e o genótipo 354 como suscetível ao estresse salino.

Os testes foram conduzidos seguindo a metodologia proposta por Lee et al. (2008) em casa de vegetação. Foram usados “*cone-tainers*” (método PC) e substrato comercial homogeneizado. O substrato foi inicialmente autoclavado por 30 min a 1,5 atm e 120° C e, em seguida, suplementado com adubação mineral NPK 10-10-10 (150 kg.ha⁻¹). Cada planta foi condicionada em suporte igualmente espaçado. Todos os tratamentos receberam irrigação por imersão de 2/3 inferior do cone em solução não salina 2 h dia⁻¹ até o estágio de desenvolvimento V3. Quando

as plantas atingiram o estágio V3, foi mantido um grupo controle sem estresse salino, com irrigação 2 h dia⁻¹ em solução não salina, e em outro grupo foi iniciada uma irrigação utilizando solução salina (120 mM NaCl), para ambos os tratamentos genótipos (Ledesma et al., 2016; Huang et al., 2018).

O estresse se estendeu até que 75% das folhas apresentassem sintoma de clorose ou necrose, que corresponde à nota de folhas queimadas 4 (quatro) no genótipo suscetível. Para a determinação da nota de folhas queimadas pela injúria ao estresse salino, foi utilizada uma escala de 1 até 5 (Pantalone et al., 1997), em que 1 = sem clorose aparente; 2 = sintoma leve (25% das folhas com clorose); 3 = moderado (50% das folhas com clorose e algumas necroses); 4 = clorose severa (75% das folhas com clorose aparente e necrose severa); e 5 = morte da planta (folhas com necrose severa e senescência). A média das notas de folhas queimadas foi utilizada para discriminar o genótipo resistente do suscetível, tendo sido calculadas seguindo:

$$\bar{X}_{lss} = \frac{\sum_1^{pl_s} LSSi \times pl_s}{pl_r}$$

em que $LSSi$ (1,...,5) são as notas de folhas queimadas atribuídas, pl_s são as plantas com sintoma e pl_r é a constante de ponderação entre os tratamentos, correspondente ao número de plantas na unidade amostral.

O experimento foi repetido três vezes para observar a consistência da resposta e as médias foram utilizadas em teste de médias. Para coleta de amostras de folhas para a análise proteômica, um novo experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, cada repetição contendo oito plantas. Os tratamentos consistiram de um fatorial dos dois genótipos (771 resistente e o 354 susceptível) sob estresse salino e sob condições controle. O último trifólio totalmente expandido de cada planta da repetição foi coletado para compor um *bulk*, sendo coletados três *bulks* para cada tratamento (triplicata).

3.2.3.2. Preparo de amostras proteicas

Os extratos proteicos foram preparados em triplicatas biológicas (*bulk* de 300 mg de matéria fresca cada). O protocolo de extração foi o mesmo utilizado no capítulo anterior (Capítulo 1), com TCA/acetona, adaptado de Damerval et al.

(1986). Antes da digestão proteica também foi utilizada uma precipitação usando a metodologia do metanol/clorofórmio (Nanjo et al., 2012), conforme descrito no capítulo 1. Após a precipitação, as amostras foram suspensas em solução ureia 7 M e Tiourea 2 M para adequada suspensão. A digestão proteica foi feita utilizando a metodologia de filtro auxiliar (FASP - *filter-aided sample preparation*), descrita por Wiśniewski et al. (2009), com pequenas modificações. Antes do início da digestão, foi feito um teste de integridade dos filtros (Hernandez-Valladares et al., 2016).

Após o teste, 100 µg de proteínas de cada amostra foram adicionados a um filtro Microcon-30 kDa (Lipecka et al., 2016), lavado com 200 µL 50 mM de bicarbonato de amônio (solução A) e centrifugado a 10.000g por 15 min a 25 °C (todas as centrifugações nesta etapa foram feitas nesta condição). Esta lavagem foi repetida mais uma vez para remoção completa da ureia antes da redução das proteínas. Posteriormente, foram adicionados 100 µL 50 mM DTT refrigerada feita em solução A, agitada e incubada por 20 min a 60 °C (1 min agitando e 4 min parado, a 650 rpm). Após esta etapa, foram adicionados 200 µL de 8 M ureia e 50 mM de bicarbonato de amônio (solução B), centrifugado por 15 min. Para alquilação das proteínas, 100 µL com 50 mM de iodoacetamida refrigerado, preparados em solução B, foram adicionados, agitados e incubados por 20 min a 25 °C na ausência de luz (1 min agitando e 19 min parado, a 650 rpm). Posteriormente, foram feitas duas lavagens com 200 µL de solução B e centrifugadas por 15 min. Por fim, foi feita mais uma lavagem com solução A. Nesta última lavagem, centrifugou-se até que permanecessem aproximadamente 50 µL de amostra.

Para digestão proteica, foram adicionados 25 µL de 0,2% (v/v) RapiGest (Waters, Milford, CT, USA) e 25 µL de solução de tripsina (40 ng/µL, V5111, Promega, Madison, WI, USA), agitada gentilmente e incubada por 16 h a 37 °C (1 min agitando e 4 min parado, a 650 rpm). Para eluição dos peptídeos, o filtro foi transferido para um novo microtubo e centrifugado por 10 min. Foram adicionados 50 µL de solução A e centrifugado por 15 min. Esta lavagem foi refeita duas vezes. Para precipitação do RapiGest e inibição da tripsina, foram adicionados 5 µL de 15% ácido trifluoroacético (TFA, Sigma-Aldrich), agitado gentilmente e incubado por 30 min a 37 °C. Então as amostras foram centrifugadas por 15 min, e os sobrenadantes, coletados e secos a vácuo. Os peptídeos foram suspensos em 100 µL de solução contendo 95% 50 mM de bicarbonato de amônio, 5% acetonitrila

e 0,1% ácido fórmico. Os peptídeos resultantes foram quantificados utilizando um NanoDrop 2000c espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific) utilizando leituras a 205 nm.

Os parâmetros de espectrometria de massas também seguiram a descrição no capítulo anterior (Capítulo 1). Contudo não foi utilizada uma injeção de 500 ng de proteínas para uma normalização, mas, sim, considerada a normalização pela quantificação feita em NanoDrop, injetando 2,5 µg de proteínas. O gradiente descrito anteriormente foi alterado, sendo agora composto de fase móvel A, contendo água mais 0,1% de ácido fórmico, e fase móvel B, composta por acetonitrila mais 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição foi iniciado a 5% B, aumentando para 40% até 91,12 min e de 40% de B para 99% até 95,12 min, sendo mantido até 99,12 min, diminuindo então para 5% de B até 101,12 min e mantido 5% B até o final da injeção a 117,00 min.

As configurações do instrumento foram baseadas na aquisição independente de dados (DIA), aprimoradas por espectrometria de mobilidade iônica (Distler et al., 2016) (IMS) e tiveram pequenas alterações em relação à descrição ao capítulo anterior. Resumidamente, a espectrometria de massas foi feita em modo positivo e modo resolução (modo V), 35.000 FWHM, com mobilidade iônica. A separação da mobilidade iônica (HDMSE) usou uma rampa de velocidade da onda IMS, começando com 800 m.s⁻¹ e terminando com 500 m.s⁻¹, fluxo de hélio e de gás IMS de 180 e 90 mL.min⁻¹, respectivamente. A energia de transferência de colisão variou de 25 V a 55 V em modo de alta energia. A voltagem do cone e os capilares foram de 30 V e 3000 V, respectivamente. Foram usados um nanofluxo de gás de 0,5 bar e gás de purga de 150 L.h⁻¹. A temperatura da fonte foi configurada para 100°C. Ademais, os parâmetros TOF e calibrante externo continuaram como descrito anteriormente (Capítulo 1).

3.2.3.3. Bioinformática e Análises Estatísticas

O processamento dos espectros e os bancos de referência foram feitos utilizando o software ProteinLynx Global SERVER (PLGS, v.3.02) (Waters) com os parâmetros Apex3D e a quantificação no software ISOQuant v.1.7 descrito anteriormente (Capítulo 1). Foi utilizado o banco de dados de proteínas de soja (*Glycine max* [L.], *Soybean - Strain: cv. Williams 82 - txid 3847* – acessado em 20-

12-2019) proveniente do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI, com inserção manual de genes transgênicos da soja ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein?term=txid3847\[Organism\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein?term=txid3847[Organism])).

Para garantir a qualidade dos resultados após o processamento dos dados, apenas proteínas presentes nas três amostras biológicas foram aceitas para análise de acúmulo diferencial. As proteínas seriam consideradas diferencialmente acumuladas se a comparação entre dois tratamentos apresentasse diferença significativa pelo Teste T ($p\text{-value} < 0,05$) entre as médias das triplicatas e se o valor do acúmulo relativo (tratado/controle) fosse maior do que 1,5 vezes. As anotações funcionais foram feitas usando o software OMICSBOX v1.1 (Conesa et al., 2005). Foi feito um teste de médias utilizando a metodologia bootstrap, procedendo à análise de variância 10 mil vezes com subamostras dos dados de score de folhas de três experimentos em delineamento inteiramente casualizado, com 8 repetições ($n=4$).

3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os potenciais genótipos selecionados para a triagem, houve uma resposta contrastante entre o genótipo 771 e o genótipo 354, apresentando médias significativamente diferentes de scores de clorose distinta nas folhas (Figura 9). O Após a submissão ao estresse salino, o genótipo 771 apresentou média de 1,49 e o genótipo 354, média de 4,62.

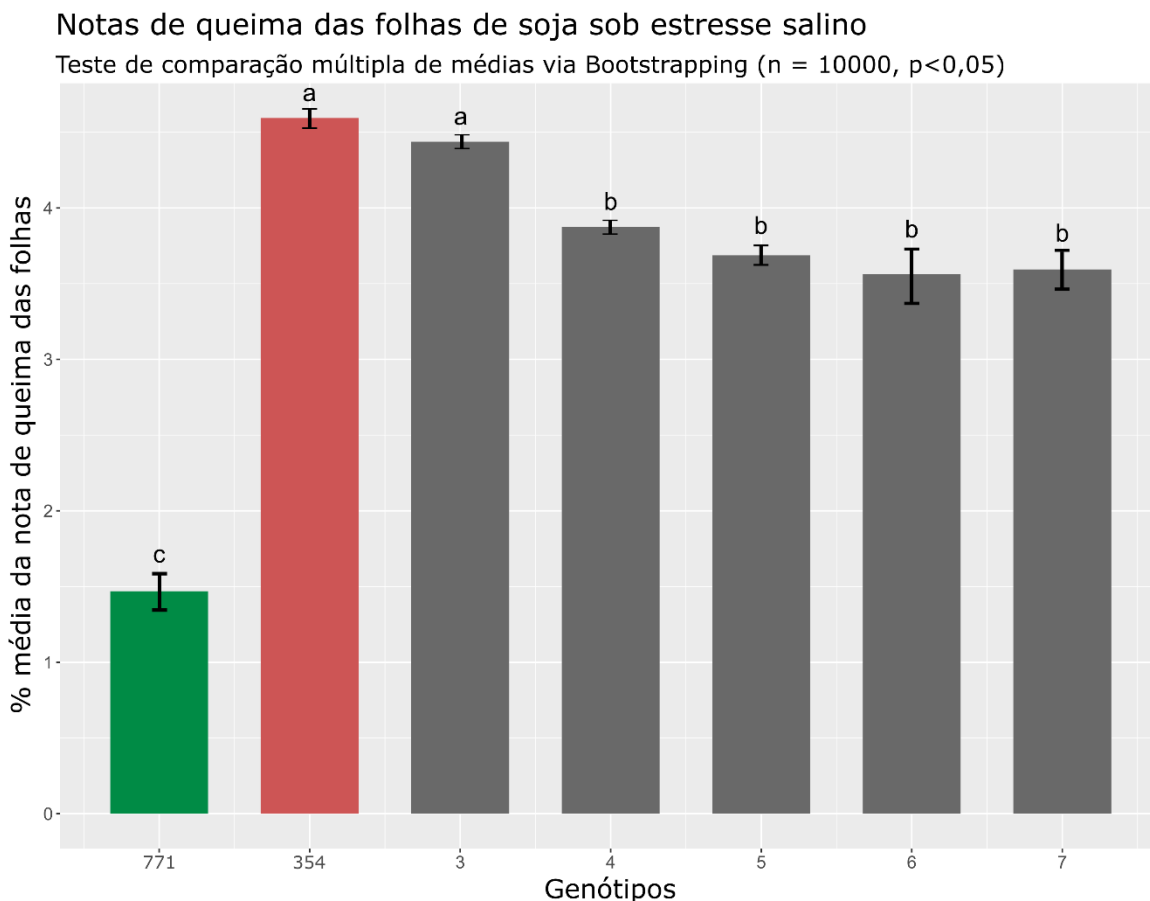


Figura 9. Teste de comparação de médias múltiplas para notas de queima de folhas entre sete genótipos de soja (*Glycine max*) submetidos ao estresse salino com 120 mM de NaCl. A coluna verde indica média de notas do genótipo resistente 771 e a vermelha, do genótipo 354 suscetível, selecionados para a análise proteômica comparativa.

Essa resposta contrastante pode ser observada no fenótipo da planta, tendo sido observada menor clorose e coloração mais intensa das folhas no genótipo 771 (Figura 10). Durante os experimentos de triagem dos genótipos, o tempo médio observado para o início dos sintomas foi de 6-9 dias para nota 4 no genótipo suscetível 354. Foi observada perda na turgescência das folhas (flacidez ao toque), principalmente no genótipo suscetível 354, mas também observada em menor intensidade no genótipo resistente 771. Esses sintomas caracterizam o estresse salino após longa exposição ao sal após choque salino. Provavelmente a planta tenha evitado a perda de água por transpiração para tentar diluir os sais em excesso nos tecidos (Golldack et al., 2014).



Figura 10. Plantas de soja (*Glycine max*) com sete dias de estresse salino com 120 mM de NaCl. À esquerda, o genótipo 771, identificado como resistente ao estresse salino, e à direita, o genótipo 354, identificado como suscetível ao estresse salino.

Foi obtido o perfil proteico de ambos os genótipos para tentar identificar possíveis processos ocorrendo nas plantas que confeririam resposta contrastante ao estresse salino. Foram identificadas no total 1831 proteínas. A análise proteômica comparativa foi feita para as condições 354 sob estresse/354 controle, 771 sob estresse/771 controle, 771 controle/354 controle e 771 sob estresse/354 sob estresse. No total, 919 proteínas diferencialmente acumuladas foram observadas nas quatro comparações feitas. A anotação funcional dessas proteínas com acúmulo diferencial foi agrupada em 25 principais processos biológicos (Figura 11).

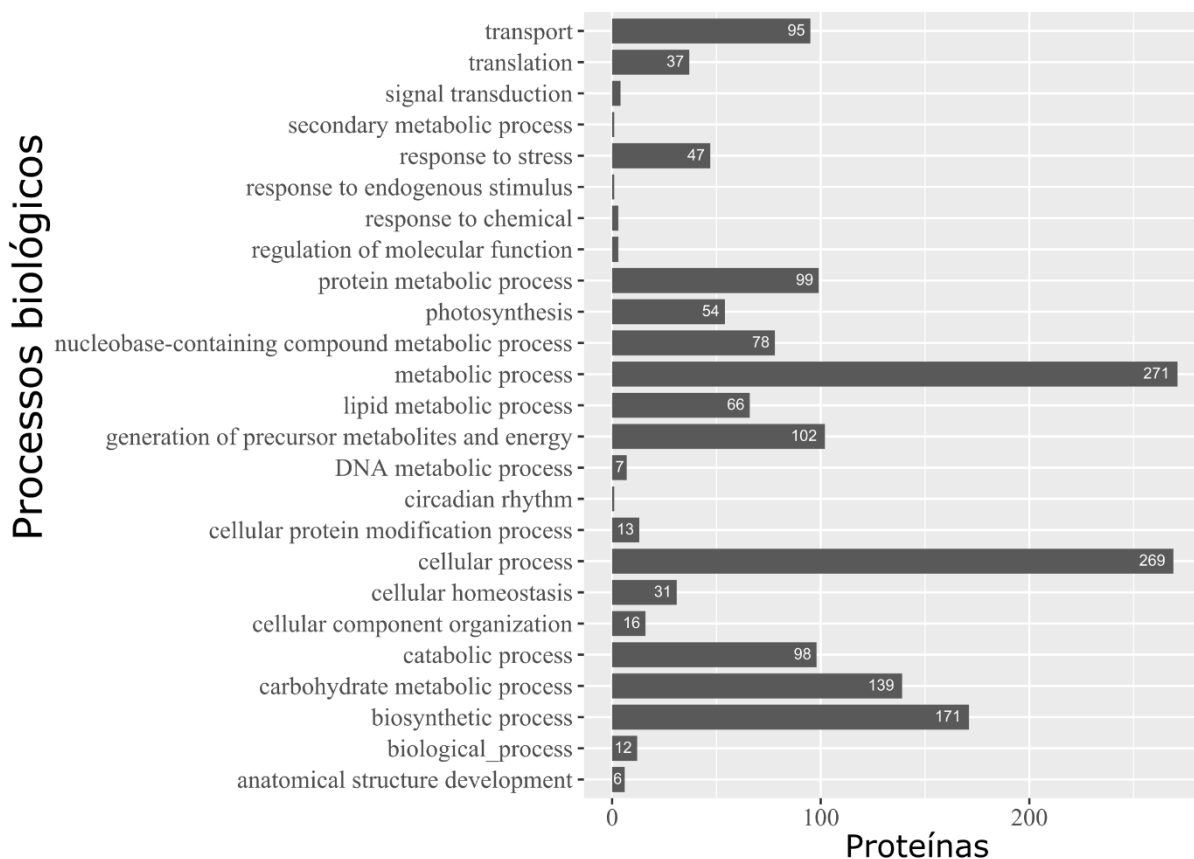


Figura 11. Processos biológicos das proteínas encontradas com acúmulo diferencial entre a comparação de genótipo de soja suscetível sob estresse salino a 120 mM de NaCl e sob condições normais (controle), genótipo resistente sob estresse e seu controle, e entre genótipos em ambas as condições.

Foram observados alguns processos que podem ser importantes na resposta ao estresse como o processo biológico transdução de sinais, lipídeos, resposta ao estresse, estímulo endógeno e a químicos. Contudo, grande parte das proteínas com acúmulo diferencial estão participando de processos biológicos básicos da fisiologia da planta, como transporte, processos metabólicos de proteínas, processos metabólicos, geração de metabólitos precursores, energia, processos celulares, processos catabólicos, de carboidratos e biossintéticos.

Assim, é possível observar que a resposta do genótipo resistente pode estar relacionada a uma maior atividade com proteínas relacionadas a processos básicos, mas que, com maior intensidade, permitem à planta se desenvolver sob estresse. Por exemplo, processos relacionados à manutenção osmótica, aceleração energética ou à produção acelerada de proteínas podem auxiliar a

planta a lidar melhor com condições em que a concentração de sais nos tecidos seria prejudicial, mas uma resposta rápida ou com maior intensidade permite à planta evitar a senescência prematura (Munns e Tester, 2008).

Para identificar algum padrão de resposta no perfil proteico dos genótipos, as intensidades de contagem de íons de cada triplicata biológica foram utilizadas para uma redução de dimensionalidade (proteínas) com a análise de componentes principais (PCA) e na análise de fatores baseados nos métodos estatísticos propostos por Hauskrecht et al. (2007) (Figuras 12 e 13). A análise do perfil proteico dos dois genótipos também revelou resposta contrastante entre os genótipos, corroborando o observado no fenótipo.

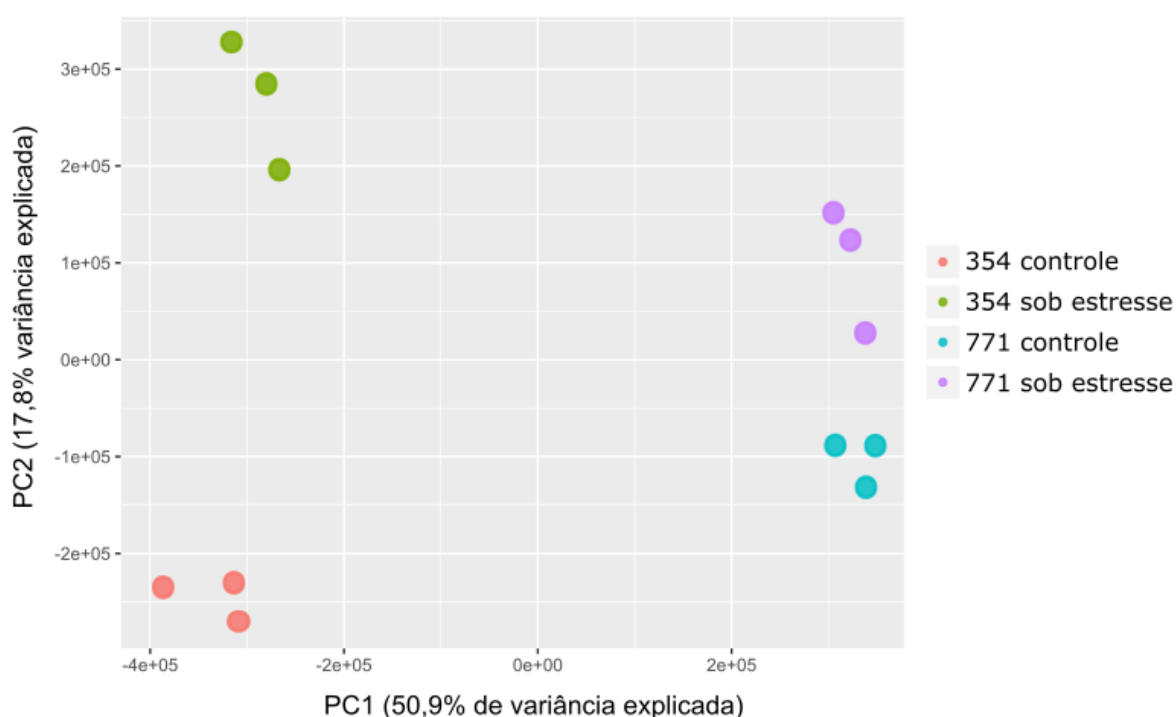


Figura 12. Análise de Componentes Principais (PCA) para redução da dimensionalidade (as proteínas foram consideradas dimensões). As triplicatas do genótipo resistente (771), tanto sob condição de estresse quanto no controle, foram agrupadas e destacadas à direita. As triplicatas do genótipo suscetível (354), tanto sob condição de estresse quanto no controle, foram agrupadas e destacadas à esquerda no primeiro componente.

Na PCA, foi possível observar um padrão entre as amostras na intenção de reduzir a variância de 1831 proteínas variando entre os tratamentos em apenas 2 novas variáveis (os dois primeiros componentes). Observa-se que as proteínas que contribuíram para aproximadamente 50,9% da variância entre as amostras separaram os genótipos nos extremos da primeira dimensão (Figura 12). O genótipo 771 ficou agrupado à direita do eixo das abcissas e o genótipo suscetível ficou agrupado à esquerda (Figura 12). Se fosse utilizada somente uma dimensão da PCA, seria observado que os fatores genótipos se sobreporiam. Isso nos leva a observar que aproximadamente 17,8% da variância das proteínas praticamente explica a resposta do perfil proteico ligeiramente diferente do genótipo suscetível sob estresse e sob condição normal, observado no segundo componente (Figura 12).

Pela análise PCA, é possível concluir que o genótipo 771 tem um perfil proteico muito semelhante tanto sob condições normais para o desenvolvimento, quanto sob estresse salino (Figura 12). Apesar de características como a tolerância a alguns estresses serem bem descritas como características poligênicas, já identificadas também como poligênicas em soja silvestre (*Glycine soja*) (Ha et al., 2013), esse resultado pode permitir uma atribuição dessa característica a um conjunto menor de genes, o que facilita o processo de melhoramento assistido por marcadores.

Assim, a comparação foi decomposta com foco principal na comparação entre o genótipo resistente e o genótipo suscetível, observando principalmente o primeiro componente da PCA, validando a resposta nos demais comparações. Além de identificar quais amostras apresentaram uma resposta semelhante, é possível identificar quais proteínas variaram mais entre os tratamentos, possivelmente permitindo um desempenho superior do genótipo resistente. Uma análise de fatores foi feita para identificar as proteínas que explicam os 50,9 % da variância que separa o genótipo resistente do suscetível na PCA. Essa análise de fatores foi baseada nas correlações entre a contagem de íons do genótipo suscetível controle e sob estresse e o genótipo resistente controle e sob estresse (Figura 13).

Como esperado pela análise de PCA, praticamente metade das proteínas apresentou resposta diferente entre o genótipo resistente e o genótipo suscetível, representando uma correlação negativa (em vermelho, Figura 13). Foi possível

observar 5 principais grandes grupos (fatores) de proteínas que apresentaram um acúmulo menor no genótipo resistente, considerando o padrão comum esperado de aumento (diagonal). As proteínas pertencentes a esses grupos são potenciais candidatos a biomarcadores e podem representar uma nova dimensão para a seleção molecular de genótipos de soja sob estresse salino.

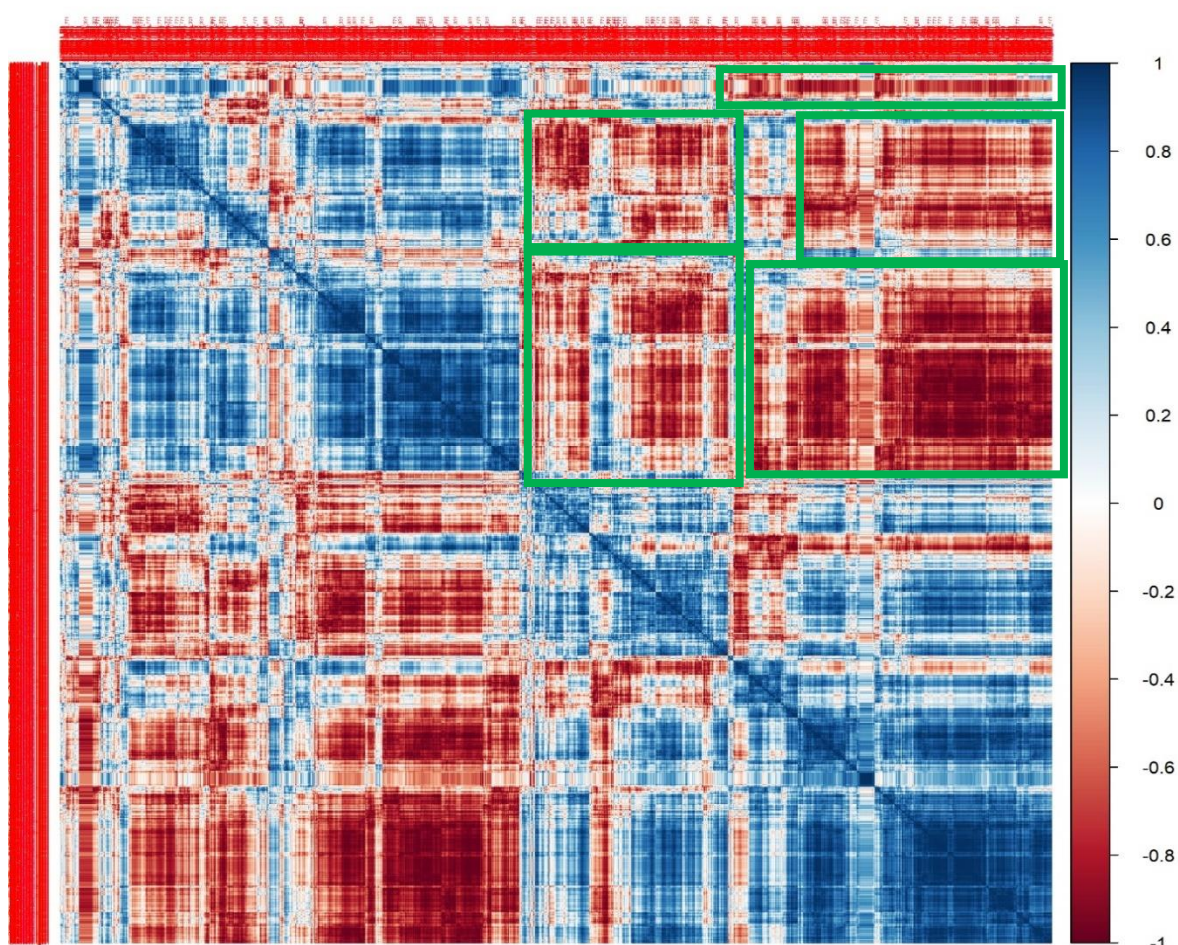


Figura 13. Correlações entre 1831 proteínas observadas em um genótipo de soja suscetível ao estresse salino (120 mM de NaCl) e as mesmas proteínas observadas em um genótipo resistente.

A grande quantidade de proteínas com acúmulo antagônico entre os genótipos suscetível e resistente nos permite inferir que, ao contrário do senso de que o genótipo resistente estaria produzindo proteínas a mais para lidar com o

estresse, pode na verdade estar reduzindo o gasto energético para lidar com o estresse. Possivelmente as poucas proteínas observadas nos processos biológicos relacionados à resposta ao estresse e transdução de sinais possam estar iniciando uma cascata de sinalização para diminuir a atividade metabólica, como já descrito em outros trabalhos (Liu et al., 2019; Yan-hua et al., 2019).

Para verificar o comportamento das proteínas, foi feita anotação funcional das proteínas com acúmulo diferencial na comparação entre o genótipo resistente sob condições de estresse salino e o genótipo suscetível também na condição de estresse salino (Figura 14). Nessa comparação, foram observadas 153 DAPs down acumuladas no genótipo resistente, a maioria pertencendo aos processos biológicos de processo metabólico, de carboidratos, lipídico e processo celular. Essa grande quantidade de DAPs down acumuladas no genótipo resistente confirma a diminuição da atividade celular desse genótipo sob condições de estresse salino. Isso também foi observado em tomate, em que a redução dos gastos energéticos estava voltada para a manutenção da membrana plasmática para uma melhor atividade da H⁺-APTase e homeostase da relação K⁺/Na⁺ (Yu et al., 2018).

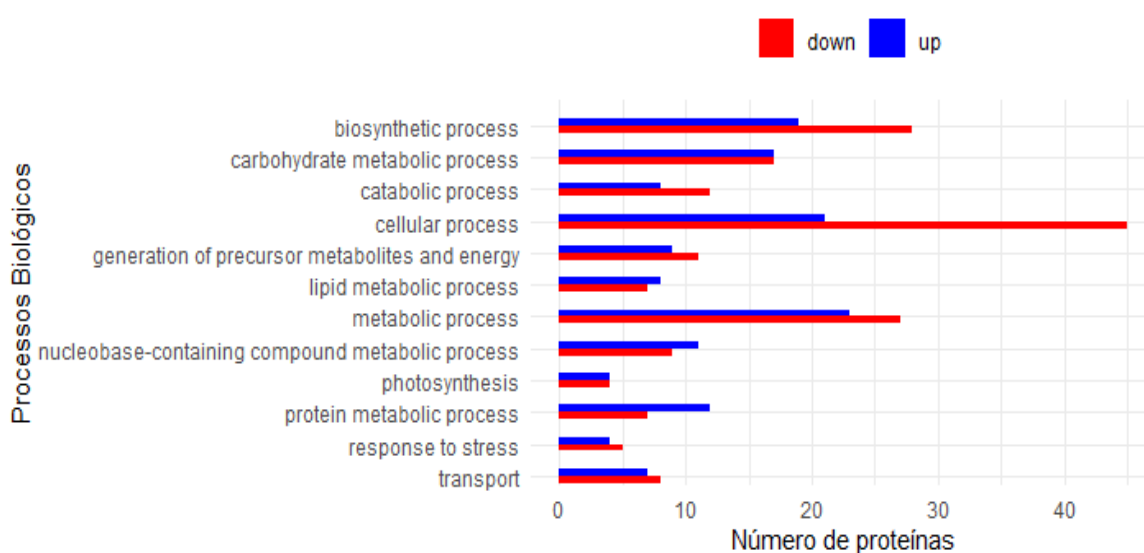


Figura 14. Anotação funcional de proteínas diferencialmente acumuladas entre genótipos de soja resistente 771 e suscetível 354, sob condições de estresse salino com 120 mM de NaCl.

Já nas proteínas que apresentaram maior acúmulo no genótipo resistente, predominantemente estavam envolvidas com processo metabólico de carboidratos, processo metabólico lipídico, resposta ao estresse e tradução. Entre essas proteínas do genótipo resistente ao tratamento de estresse salino, foi encontrada a família de proteínas 14-3-3. A família das proteínas 14-3-3 está presente em diversos contextos celulares, atuando na regulação da sinalização hormonal (como o ácido abscísico) e homeostases (Camoni et al., 2018). Além disso, recentemente foi mostrado que proteínas 14-3-3 ativadas por cálcio são capazes de ativar a tolerância ao estresse salino (Yang et al., 2019). Em plantas transgênicas de Tabaco superexpressando o gene BdGF14d da família 14-3-3 de *Brachypodium distachyon*, foi visto que este gene melhora a tolerância a estresse salino em diferentes tratamentos com cloreto de sódio (He et al., 2017). Desta forma, as proteínas 14-3-3 podem ter contribuído para a resistência ao estresse salino observado no genótipo 771.

Outra proteína presente no genótipo resistente durante o estresse salino é a glutathione transferase. A expressão de um gene de glutathione transferase (*tau-class glutathione S-transferase*) de *Glycine soja* (soja silvestre) em *Medicago sativa* foi capaz de regular positivamente as respostas ao estresse salino e alcalino, sendo apontada como um gene candidato à geração de plantas resistentes a esses estresses (Jia et al., 2016). Da mesma forma, plantas de transgênicas de *A. thaliana* expressando o gene LeGSTU2, uma glutathione transferase de tomate (*Lycopersicon esculentum*), apresentaram maior resistência ao estresse hídrico e salino em relação ao ecótipo 'Columbia' silvestre (Xu et al., 2015).

Além disso, em experimentos com cloreto de sódio (50, 100 e 150 mM), sementes transgênicas de *Arabidopsis thaliana* superexpressando um gene de glutathione transferase apresentaram taxa de germinação até quase três vezes maior quando comparada às sementes silvestres (Qi et al., 2010b). Estes resultados evidenciam a participação das glutathione transferases na resistência ao estresse salino observada no genótipo resistente de soja.

A família das Nucleosome assembly protein (NAP) também foi encontrada no genótipo resistente durante o estresse salino, indicando sua atuação na tolerância a esse estresse. As NAP são proteínas chaperonas de histonas localizadas no núcleo celular, onde atuam na tolerância ao estresse salino e no

reparo de DNA. Em *A. thaliana*, plantas com mutação simultânea em três genes da família das NAP (AtNAP1;1, AtNAP1;2 e AtNAP1;3) hipersensitivas ao ABA apresentam baixa tolerância ao estresse salino (Liu et al., 2009).

Em outro trabalho, também foi mostrada a participação dos genes NAP1 e NAP1-related na resistência ao estresse salino e no reparo do DNA através de recombinação homóloga (Gao et al., 2012). Assim, estes dados indicam que proteínas NAP são potenciais marcadores de tolerância ao estresse salino para genótipos de soja.

Outra DAP do genótipo resistente foi uma phospholipase D, enzima que catalisa a formação do ácido fosfatídico. O ácido fosfatídico regula a organização dos microtúbulos em resposta ao estresse salino, através das proteínas associadas a microtúbulo (MAP65-1). Neste contexto, as plantas de *A. thaliana* mutantes para os genes de phospholipase D e MAP65-1 apresentam baixa sobrevivência quando transferidas para meio de cultura com 200 mM de NaCl no sétimo dia de idade (Zhang et al., 2012). Essa proteína também pode participar da sinalização extracelular para o estresse, ativando vias de sinalização com fitohormônios, principalmente com ácido jasmônico (Wang et al., 2000).

Durante este trabalho, uma S-adenosylmethionine synthase (SAM), associada na literatura à produção de etileno e poliaminas, foi encontrada apenas em folhas do genótipo resistente no tratamento de estresse salino. Em um trabalho com tabaco, plantas expressando o gene de SAM de uma espécie de salsa foram mais resistentes ao estresse salino. O aumento da resistência ao sal também foi associado aos níveis das poliaminas espermidina, putrescina e espermina, podendo ser também fontes de investigação para encontrar biomarcadores para resistência de soja ao estresse salino (Qi et al., 2010a).

Outro trabalho evidenciou que a expressão heteróloga do gene de SAM1 de *Cucumis sativus* (CsSAMS1) em *Escherichia coli* aumentou o crescimento desta bactéria em meio de cultura contendo cloreto de sódio. Plantas transgênicas de tabaco expressando CsSAMS1 também apresentaram maior tolerância ao estresse salino em relação a plantas silvestres (He et al., 2019). Em outro estudo, a superexpressão de genes de SAM1 em tomate aumentou a resistência das plantas transgênicas ao estresse alcalino nas folhas. Além disso, a homeostase dos íons Na⁺ e K⁺ foi alterada, com menor e maior acumulação destes íons nas plantas

transgênicas para SAM1, respectivamente (Freitas et al., 2018). Desta forma, DAPs SAM observadas apenas no tratamento salino com o genótipo resistente indicam que esta proteína também é um potencial marcador de tolerância a este estresse.

3.2.5. CONCLUSÃO

Foram identificados novos componentes envolvidos na resposta ao estresse salino em soja. Algumas proteínas com maior acúmulo no genótipo resistente estavam diretamente relacionadas com o estresse, anotadas em transporte de proteínas, resposta a estresse e homeostase celular com poucas sendo responsáveis pela sinalização envolvendo ácido jasmônico para iniciar uma resposta. O genótipo resistente apresentou várias proteínas DAPs envolvidas em processos biológicos de processo metabólico, de carboidratos, lipídico e processo celular e energia. A maioria das proteínas pertencentes a esses processos estava com acúmulo menor no genótipo resistente, indicando uma possível redução da atividade metabólica, provavelmente para alocar recursos para suportar o estresse sem comprometer os tecidos vegetais. Notou-se pouca diferença na resposta do genótipo resistente ao estresse, como o tamanho de plantas e acúmulo de proteínas. Isso pode significar um desafio para o melhoramento em obter novas cultivares produtivas com resistência ao estresse salino, já que aparentemente o genótipo suscetível tem um desenvolvimento mais acelerado, embora não resista ao estresse.

A análise proteômica permitiu destacar possíveis marcadores de estresse salino para a cultura da soja. Essas marcas apresentam chances muito maiores de estarem associadas com a característica, pois foram identificadas sob condições controladas. Um programa de melhoramento pode utilizar essas marcas em uma população de mapeamento e verificar como as marcas segregam na soja, acelerando um programa de melhoramento assistido por marcadores. As proteínas relacionadas à família de proteínas 14-3-3 foram detectadas no genótipo resistente (ACU19643.1 e GF14D). Algumas glutathione S-transferases (KRH32371.1, HSP26-A e GST3), também algumas proteínas de montagem de nucleossomos

(KRH37412.1, P0CG89 e F20B18.220), proteínas relacionadas à fosforilase D (KRH09736.1) e também proteínas relacionadas a S-adenosilmetionina sintase (KRH32501.1) são potenciais candidatos a biomarcadores moleculares

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ab Rahman, S.F.S., Singh, E., Pieterse, C.M.J. , Schenk, P.M. (2018) Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science* 267:102-111. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>
- Agrios, G.N. (2005) Plant diseases caused by fungi. *In: Plant Pathology*. vol 4, p. 385-614. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047378-9.50017-8>
- Andrade, S.S., Silva-Lucca, R.A., Santana, L.A., Gouvea, I.E., Juliano, M.A., Carmona, A.K., Araújo, M.S., Sampaio, M.U. , Oliva, M.L.V. (2011) Biochemical characterization of a cysteine proteinase from *Bauhinia forficata* leaves and its kininogenase activity. *Process Biochemistry* 46(2):572-578. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.10.008>
- Barbieri, G., Vallone, S., Orsini, F., Paradiso, R., De Pascale, S., Negre-Zakharov, F. , Maggio, A. (2012) Stomatal density and metabolic determinants mediate salt stress adaptation and water use efficiency in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Plant Physiology* 169(17):1737-1746. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.07.001>
- Bari, R. , Jones, J.D.G. (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69(4):473-488. doi:<https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>

- Bartsch, M., Gobatto, E., Bednarek, P., Debey, S., Schultze, J.L., Bautor, J. , Parker, J.E. (2006) Salicylic acid-independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 signaling in Arabidopsis immunity and cell death is regulated by the monooxygenase FMO1 and the nudix hydrolase NUDT7. *The Plant Cell* 18(4):1038-1051. doi:<https://doi.org/10.1105/tpc.105.039982>
- Bell, J.K., Mullen, G.E., Leifer, C.A., Mazzoni, A., Davies, D.R. , Segal, D.M. (2003) Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends in Immunology* 24(10):528-533. doi:[https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(03\)00242-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(03)00242-4)
- Bentham, A.R., Zdrzałek, R., Concepcion, J.C. , Banfield, M.J. (2018) Uncoiling CNLs: Structure/function approaches to understanding CC domain function in plant NLRs. *Plant and Cell Physiology* 59(12):2398-2408. doi:<https://doi.org/10.1093/pcp/pcy185>
- Berr, A., McCallum, E.J., Alioua, A., Heintz, D., Heitz, T. , Shen, W.-H. (2010) Arabidopsis histone methyltransferase set domain GROUP8 mediates induction of the jasmonate/ethylene pathway genes in plant defense response to necrotrophic fungi. *Plant Physiology* 154(3):1403-1414. doi:<https://doi.org/10.1104/pp.110.161497>
- BESPALHOK, F.J.C., GUERRA, E.P. , OLIVEIRA, R. (2007) *Introdução ao Melhoramento de Plantas*.
- Bigeard, J., Colcombet, J. , Hirt, H. (2015) Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant* 8(4):521-539. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>
- Bindschedler, L.V., Dewdney, J., Blee, K.A., Stone, J.M., Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish, C. , Davies, D.R. (2006) Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. *The Plant Journal* 47(6):851-863. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2006.02837.x>

- Borém, A., Miranda, G.V. , Fritsche-Neto, R. (2017) Melhoria visando à resistência a doenças. *In: Melhoria de plantas*. 7 ed ed., Viçosa - MG: Editora UFV, p.
- Byrt, C.S., Xu, B., Krishnan, M., Lightfoot, D.J., Athman, A., Jacobs, A.K., Watson-Haigh, N.S., Plett, D., Munns, R., Tester, M. , Gilliam, M. (2014) The Na⁺ transporter, TaHKT1;5-D, limits shoot Na⁺ accumulation in bread wheat. *The Plant Journal* 80(3):516-526. doi:<https://doi.org/10.1111/tpj.12651>
- Calderan-Rodrigues, M.J., Jamet, E., Bonassi, M.B.C.R., Guidetti-Gonzalez, S., Begossi, A.C., Setem, L.V., Franceschini, L.M., Fonseca, J.G. , Labate, C.A. (2014) Cell wall proteomics of sugarcane cell suspension cultures. *Proteomics* 14(6):738-749. doi:<https://doi.org/10.1002/pmic.201300132>
- Camoni, L., Visconti, S., Aducci, P. , Marra, M. (2018) 14-3-3 proteins in plant hormone signaling: Doing several things at once. *Frontiers in Plant Science* 9(297)doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00297>
- Caplan, Jeffrey L., Kumar, Amutha S., Park, E., Padmanabhan, Meenu S., Hoban, K., Modla, S., Czymmek, K. , Dinesh-Kumar, Savithamma P. (2015) Chloroplast stromules function during innate immunity. *Developmental Cell* 34(1):45-57. doi:<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.05.011>
- Chen, Z.-Y., Brown, R.L. , Cleveland, T.E. (2004) Evidence for an association in corn between stress tolerance and resistance to *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination. *African Journal of Biotechnology* 3(12):693-699. doi:<https://doi.org/10.4314/ajb.v3i12.15040>
- Chen, Z.-Y., Brown, R.L., Damann, K.E. , Cleveland, T.E. (2002) Identification of unique or elevated levels of kernel proteins in aflatoxin-resistant maize genotypes through proteome analysis. *Phytopathology* 92(10):1084-1094. doi:<https://doi.org/10.1094/phyto.2002.92.10.1084>
- Chen, Z.Y., Brown, R.L., Damann, K.E. , Cleveland, T.E. (2007) Identification of maize kernel endosperm proteins associated with resistance to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 97(9):1094-1103. doi:<https://doi.org/10.1094/phyto-97-9-1094>

- Chew, O., Whelan, J. , Millar, A.H. (2003) Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *Journal of Biological Chemistry* 278(47):46869-46877. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.m307525200>
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M. , Robles, M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21(18):3674-3676. doi:<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>
- Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M. , Thiellement, H. (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7(1):52-54. doi:<https://doi.org/10.1002/elps.1150070108>
- Dangl, J.L. , Jones, J.D.G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411(6839):826-833. doi:<https://doi.org/10.1038/35081161>
- Daoud, A.M., Hemada, M.M., Saber, N., El-Araby, A.A. , Moussa, L. (2018) Effect of Silicon on the Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L.) to Salt Stress at Different Growth Stages: Case Study for the Management of Irrigation Water. *Plants* 7(2):29-42. doi:<https://doi.org/10.3390/plants7020029>
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M. , Cohen, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical Journal* 351(1):95-105. doi:<https://doi.org/10.1042/bj3510095>
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P., Levin, Y., Schild, H. , Tenzer, S. (2014) Drift time-specific collision energies enable deep-coverage data-independent acquisition proteomics. *Nature Methods* 11(2):167-170. doi:<https://doi.org/10.1038/nmeth.2767>
- Distler, U., Kuharev, J., Navarro, P. , Tenzer, S. (2016) Label-free quantification in ion mobility-enhanced data-independent acquisition proteomics. *Nature Protocols* 11(4):795-812. doi:<https://doi.org/10.1038/nprot.2016.042>

- Esch, L. , Schaffrath, U. (2017) An update on Jacalin-like lectins and their role in plant defense. *International Journal of Molecular Sciences* 18(7):1592. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms18071592>
- Fan, C. (2019) Genetic mechanisms of salt stress responses in halophytes. *Plant Signaling & Behavior*.1704528. doi:<https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1704528>
- Feng, Z., Ding, C., Li, W., Wang, D. , Cui, D. (2020) Applications of metabolomics in the research of soybean plant under abiotic stress. *Food Chemistry* 310:125914. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125914>
- Foolad, M.R. , Lin, G.Y. (1997) Genetic potential for salt tolerance during germination in *Lycopersicon* species. *HortScience* 32(2):296. doi:<https://doi.org/10.21273/hortsci.32.2.296>
- Freitas, V.S., Miranda, R.d.S., Costa, J.H., Oliveira, D.F.d., Paula, S.d.O., Miguel, E.d.C., Freire, R.S., Prisco, J.T. , Gomes-Filho, E. (2018) Ethylene triggers salt tolerance in maize genotypes by modulating polyamine catabolism enzymes associated with H₂O₂ production. *Environmental and Experimental Botany* 145:75-86. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.10.022>
- Gaikpa, D.S. , Miedaner, T. (2019) Genomics-assisted breeding for ear rot resistances and reduced mycotoxin contamination in maize: methods, advances and prospects. *Theoretical and Applied Genetics* 132(10):2721-2739. doi:<https://doi.org/10.1007/s00122-019-03412-2>
- Gao, H. , Xu, X. (2009) Depletion of Vipp1 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 affects photosynthetic activity before the loss of thylakoid membranes. *FEMS Microbiology Letters* 292(1):63-70. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01470.x>
- Gao, J., Zhu, Y., Zhou, W., Molinier, J., Dong, A. , Shen, W.-H. (2012) NAP1 Family Histone Chaperones are required for somatic homologous recombination in Arabidopsis. *The Plant Cell* 24(4):1437-1447. doi:<https://doi.org/10.1105/tpc.112.096792>

- Gassmann, W., Hinsch, M.E. , Staskawicz, B.J. (1999) The Arabidopsis RPS4 bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes. *The Plant Journal* 20(3):265-277. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.t01-1-00600.x>
- Gholizadeh, A., Dehghani, H. , Dvorak, Y. (2014) Determination of the most effective traits on wheat yield under saline stress. *Agricultural Advances* 3(4):103-110.
- Gilroy, S., Suzuki, N., Miller, G., Choi, W.-G., Toyota, M., Devireddy, A.R. , Mittler, R. (2014) A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in Plant Science* 19(10):623-630. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.06.013>
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H. , Probst, N. (2014) Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science* 5(151)doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00151>
- Gosal, S.S. , Wani, S.H. (2018) *Biotechnologies of Crop Improvement*. Springer vol 3, doi:<https://doi.org/10.1007/978-3-319-94746-4>
- Guan, R., Qu, Y., Guo, Y., Yu, L., Liu, Y., Jiang, J., Chen, J., Ren, Y., Liu, G., Tian, L., Jin, L., Liu, Z., Hong, H., Chang, R., Gilliam, M. , Qiu, L. (2014) Salinity tolerance in soybean is modulated by natural variation in GmSALT3. *The Plant Journal* 80(6):937-950. doi:<https://doi.org/10.1111/tpj.12695>
- Guo, M., Liu, X., Wang, J., Li, L., Zhang, W., Gong, B., Zhang, C. , Zhou, C. (2019) Investigation on salt-response mechanisms in *Arabidopsis thaliana* from UniProt protein knowledgebase. *Journal of Plant Interactions* 14(1):21-29. doi:<https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1551581>
- Gupta, B. , Huang, B. (2014) Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International journal of genomics* 2014:1-18. doi:<https://doi.org/10.1155/2014/701596>
- Ha, B.-K., Vuong, T.D., Velusamy, V., Nguyen, H.T., Grover Shannon, J. , Lee, J.-D. (2013) Genetic mapping of quantitative trait loci conditioning salt tolerance in wild soybean (*Glycine soja*) PI 483463. *Euphytica* 193(1):79-88. doi:<https://doi.org/10.1007/s10681-013-0944-9>

- Harris, B.N., Sadras, V.O. , Tester, M. (2010) A water-centred framework to assess the effects of salinity on the growth and yield of wheat and barley. *Plant and Soil* 336(1):377-389. doi:<https://doi.org/10.1007/s11104-010-0489-9>
- Hauskrecht, M., Pelikan, R., Valko, M. , Lyons-Weiler, J. (2007) Feature selection and dimensionality reduction in genomics and proteomics. *In: Fundamentals of data mining in genomics and proteomics*. W, D., M, G. , D, B. (eds). Boston, MA: Springer, p. 149-172. doi:https://doi.org/10.1007/978-0-387-47509-7_7
- He, M.-W., Wang, Y., Wu, J.-Q., Shu, S., Sun, J. , Guo, S.-R. (2019) Isolation and characterization of S-Adenosylmethionine synthase gene from cucumber and responsive to abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 141:431-445. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.06.006>
- He, Y., Zhang, Y., Chen, L., Wu, C., Luo, Q., Zhang, F., Wei, Q., Li, K., Chang, J., Yang, G. , He, G. (2017) A member of the 14-3-3 gene family in *Brachypodium distachyon*, bdgf14d, confers salt tolerance in transgenic tobacco plants. *Frontiers in Plant Science* 8(340)doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00340>
- Hernandez-Valladares, M., Aasebø, E., Mjaavatten, O., Vaudel, M., Bruserud, Ø., Berven, F. , Selheim, F. (2016) Reliable FASP-based procedures for optimal quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis on samples from acute myeloid leukemia patients. *Biological Procedures Online* 18(1):13. doi:<https://doi.org/10.1186/s12575-016-0043-0>
- Hok, S., Attard, A. , Keller, H. (2010) Getting the most from the host: How pathogens force plants to cooperate in disease. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(10):1253-1259. doi:<https://doi.org/10.1094/mpmi-04-10-0103>
- Hossain, H., Rahman, M.A., Alam, M.S. , Singh, R.K. (2015) Mapping of quantitative trait loci associated with reproductive-stage salt tolerance in rice. *Journal of Agronomy and Crop Science* 201(1):17-31. doi:<https://doi.org/10.1111/jac.12086>
- Huang, J., Yu, H., Guan, X., Wang, G. , Guo, R. (2015) Accelerated dryland expansion under climate change. *Nature Climate Change* 6:166–171. doi:<https://doi.org/10.1038/nclimate2837>

- Huang, L., Zeng, A., Chen, P., Wu, C., Wang, D. , Wen, Z. (2018) Genomewide association analysis of salt tolerance in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Breeding* 137(5):714-720. doi:<https://doi.org/10.1111/pbr.12623>
- Huh, G.-H., Damsz, B., Matsumoto, T.K., Reddy, M.P., Rus, A.M., Ibeas, J.I., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A. , Hasegawa, P.M. (2002) Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *The Plant Journal* 29(5):649-659. doi:<https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01247.x>
- Hussain, H., Raziq, F., Khan, I., Shah, B., Altaf, A., Ullah, W., Naeem, A., Adnan, M., Junaid, K., Shah, S.R.A. , Iqbal, M. (2016) Effect of *Bipolaris maydis* (Y. Nisik & C. Miyake) shoemaker at various growth stages of different maize cultivars. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 4(2):439-444.
- Ishiga, Y., Ishiga, T., Ikeda, Y., Matsuura, T. , Mysore, K.S. (2016) NADPH-dependent thioredoxin reductase C plays a role in nonhost disease resistance against *Pseudomonas syringae* pathogens by regulating chloroplast-generated reactive oxygen species. *PeerJ* 4:e1938. doi:<https://doi.org/10.7717/peerj.1938>
- Ishiga, Y., Ishiga, T., Wangdi, T., Mysore, K.S. , Uppalapati, S.R. (2012) NTRC and chloroplast-generated reactive oxygen species regulate *Pseudomonas syringae* pv. tomato disease development in Tomato and Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25(3):294-306. doi:<https://doi.org/10.1094/MPMI-05-11-0130>
- Ishiga, Y., Uppalapati, S.R., Ishiga, T., Elavarthi, S., Martin, B. , Bender, C.L. (2009) The phytotoxin coronatine induces light-dependent reactive oxygen species in tomato seedlings. *New Phytologist* 181(1):147-160. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02639.x>
- James, R.A., Blake, C., Byrt, C.S. , Munns, R. (2011) Major genes for Na⁺ exclusion, Nax1 and Nax2 (wheat HKT1;4 and HKT1;5), decrease Na⁺ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. *Journal of Experimental Botany* 62(8):2939-2947. doi:<https://doi.org/10.1093/jxb/err003>
- Järvi, S., Isojärvi, J., Kangasjärvi, S., Salojärvi, J., Mamedov, F., Suorsa, M. , Aro, E.-M. (2016) Photosystem II repair and plant immunity: Lessons learned from

- Arabidopsis mutant lacking the thylakoid lumen protein 18.3. *Frontiers in Plant Science* 7:405-406. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00405>
- Jia, B., Sun, M., Sun, X., Li, R., Wang, Z., Wu, J., Wei, Z., DuanMu, H., Xiao, J. , Zhu, Y. (2016) Overexpression of GsGSTU13 and SCMRP in *Medicago sativa* confers increased salt–alkaline tolerance and methionine content. *Physiologia Plantarum* 156(2):176-189. doi:<https://doi.org/10.1111/ppl.12350>
- Johal, G.S., Gray, J., Gruis, D. , Briggs, S.P. (1995) Convergent insights into mechanisms determining disease and resistance response in plant–fungal interactions. *Canadian Journal of Botany* 73(S1):468-474. doi:<https://doi.org/10.1139/b95-284>
- Johal, G.S. , Rahe, J.E. (1990) Role of phytoalexins in the suppression of resistance of *Phaseolus vulgaris* to *Colletotrichum lindemuthianum* by glyphosate. *Canadian Journal of Plant Pathology* 12(3):225-235. doi:<https://doi.org/10.1080/07060669009500992>
- Jones, J.D.G. , Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444(7117):323-329. doi:<https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kalunke, R.M., Tundo, S., Benedetti, M., Cervone, F., De Lorenzo, G. , D'Ovidio, R. (2015) An update on polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein that protects crop plants against pathogens. *Frontiers in Plant Science* 6:146-147. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00146>
- Kan, G., Ning, L., Li, Y., Hu, Z., Zhang, W., He, X. , Yu, D. (2016) Identification of novel loci for salt stress at the seed germination stage in soybean. *Breeding Science* 66(4):530-541. doi:<https://doi.org/10.1270/jsbbs.15147>
- Kan, G., Zhang, W., Yang, W., Ma, D., Zhang, D., Hao, D., Hu, Z. , Yu, D. (2015) Association mapping of soybean seed germination under salt stress. *Molecular Genetics Genomics* 290(6):2147-2162. doi:<https://doi.org/10.1007/s00438-015-1066-y>
- Kashyap, P.L., Srivastava, A.K., Tiwari, S.P. , Kumar, S. (2018) *Microbes for climate resilient agriculture*. John Wiley & Sons, doi:<https://doi.org/10.1002/9781119276050>

- Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D., Bohnert, H.J. (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell* 13(4):889. doi:<https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.889>
- Kim, K.-C., Lai, Z., Fan, B., Chen, Z. (2008) Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense. *The Plant Cell* 20(9):2357-2371. doi:<https://doi.org/10.1105/tpc.107.055566>
- Kingsbury, R.W., Epstein, E. (1984) Selection for salt-resistant spring wheat1. *Crop Science* 24(2):310-315. doi:<https://doi.org/10.2135/cropsci1984.0011183X002400020024x>
- Kiriga, W.J., Yu, Q., Bill, R. (2016) Breeding and genetic engineering of drought-resistant crops. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 9(1):7.
- Klaus, A., Heribert, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55(1):373-399. doi:<http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Kovács, I.A., Palotai, R., Szalay, M.S., Csermely, P. (2010) Community landscapes: An integrative approach to determine overlapping network module hierarchy, identify key nodes and predict network dynamics. *PLoS One* 5(9):e12528. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012528>
- Kurosawa, R.N.F., Vivas, M., Amaral, A.T., Ribeiro, R.M., Miranda, S.B., Pena, G.F., Leite, J.T., Mora, F. (2018) Popcorn germplasm resistance to fungal diseases caused by *Exserohilum turcicum* and *Bipolaris maydis*. *Bragantia* 77:36-47. doi:<https://doi.org/10.1590/1678-4499.2017035>
- Kwak, J.M., Nguyen, V., Schroeder, J.I. (2006) The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiology* 141(2):323-329. doi:<https://doi.org/10.1104/pp.106.079004>
- Lateef, D.D. (2015) DNA marker technologies in plants and applications for crop improvements. *Journal of Biosciences and Medicines* 3(05):7. doi:<https://doi.org/10.4236/jbm.2015.35002>

- Ledesma, F., Lopez, C., Ortiz, D., Chen, P., Korth, K.L., Ishibashi, T., Zeng, A., Orazaly, M., Florez-Palacios, L. (2016) A Simple Greenhouse Method for Screening Salt Tolerance in Soybean. *Crop Science* 56(2):585-594. doi:<https://doi.org/10.2135/cropsci2015.07.0429>
- Lee, J.-D., Smothers, S.L., Dunn, D., Villagarcia, M., Shumway, C.R., Carter, T.E., Shannon, J.G. (2008) Evaluation of a Simple Method to Screen Soybean Genotypes for Salt Tolerance. *Crop Science* 48(6):2194-2200. doi:<https://doi.org/10.2135/cropsci2008.02.0090>
- Leon, T.B., Linscombe, S., Subudhi, P.K. (2016) Molecular dissection of seedling salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using a high-density GBS-based SNP linkage map. *Rice* 9(1):52. doi:<https://doi.org/10.1186/s12284-016-0125-2>
- Li, H., Zhao, Q., Huang, H. (2019a) Current states and challenges of salt-affected soil remediation by cyanobacteria. *Science of the Total Environment* 669:258-272. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.104>
- Li, Z., Huang, J., Wang, Z., Meng, F., Zhang, S., Wu, X., Zhang, Z., Gao, Z. (2019b) Overexpression of Arabidopsis nucleotide-binding and leucine-rich repeat genes RPS2 and RPM1(D505V) confers broad-spectrum disease resistance in rice. *Frontiers in Plant Science* 10:417-418. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00417>
- Lipecka, J., Chhuon, C., Bourderioux, M., Bessard, M.A., Endert, P., Edelman, A., Guerrero, I.C. (2016) Sensitivity of mass spectrometry analysis depends on the shape of the filtration unit used for filter aided sample preparation (FASP). *Proteomics* 16(13):1852-1857.
- Liu, A., Xiao, Z., Li, M.-W., Wong, F.-L., Yung, W.-S., Ku, Y.-S., Wang, Q., Wang, X., Xie, M., Yim, A.K.-Y., Chan, T.-F., Lam, H.-M. (2019) Transcriptomic reprogramming in soybean seedlings under salt stress. *Plant, Cell & Environment* 42(1):98-114. doi:<https://doi.org/10.1111/pce.13186>
- Liu, Y., Song, Q., Li, D., Yang, X., Li, D. (2017a) Multifunctional roles of plant dehydrins in response to environmental stresses. *Frontiers in Plant Science* 8:1018-1019. doi:<https://doi.org/10.11669/cpj.2017.12.004>

- Liu, Y., Wang, L., Zhang, T., Yang, X., Li, D. (2017b) Functional characterization of KS-type dehydrin ZmDHN13 and its related conserved domains under oxidative stress. *Scientific Reports* 7(1):7361-7362. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-017-07852-y>
- Liu, Y., Yu, L., Qu, Y., Chen, J., Liu, X., Hong, H., Liu, Z., Chang, R., Gilliam, M., Qiu, L., Guan, R. (2016) GmSALT3, Which Confers Improved Soybean Salt Tolerance in the Field, Increases Leaf Cl⁻ Exclusion Prior to Na⁺ Exclusion But Does Not Improve Early Vigor under Salinity. *FRONTIERS* 7(1485)doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01485>
- Liu, Z.-Q., Gao, J., Dong, A.-W., Shen, W.-H. (2009) A truncated Arabidopsis nucleosome assembly protein 1, AtNAP1;3T, alters plant growth responses to abscisic acid and salt in the Atnap1;3-2 mutant. *Molecular Plant* 2(4):688-699. doi:<https://doi.org/10.1093/mp/ssp026>
- Loegering, W.Q. (1984) Genetics of the pathogen—host association. *In: The Cereal Rusts*. Loegering, W.Q. (ed), p. 165-192. doi:<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-148401-9.x5001-8>
- Machado, R.M.A., Serralheiro, R.P. (2017) Soil salinity: effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization. *Horticulturae* 3(2):30. doi:<https://doi.org/10.3390/horticulturae3020030>
- Maere, S., Heymans, K., Kuiper, M. (2005) BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics* 21(16):3448-3449. doi:<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti551>
- Maggio, A., Raimondi, G., Martino, A., De Pascale, S. (2007) Salt stress response in tomato beyond the salinity tolerance threshold. *Environmental and Experimental Botany* 59(3):276-282. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.02.002>
- Manamgoda, D.S., Rossman, A.Y., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Madrid, H., Chukeatirote, E., Hyde, K.D. (2014) The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology* 79:221-288. doi:<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>

- Melo, V.d.F. , Alleoni, L.R.F. (2009) *Química e mineralogia do solo - Conceitos básicos e aplicações*. 1 ed edSBCS, 1381p.
- Mendes, W.S., Drews, T.A., Medeiros, J.C., Rosa, J.D., Gualberto, A.V.S. , Mielezrski, F. (2017) Development and productivity of maize in response to spatial arrangement under semiarid condition of Northeastern Brazil. *Australian Journal of Crop Science* 11(3):313-321. doi:<https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.03.pne389>
- Meng, L., Zhang, T., Geng, S., Scott, P.B., Li, H. , Chen, S. (2019) Comparative proteomics and metabolomics of JAZ7-mediated drought tolerance in Arabidopsis. *Journal of Proteomics* 196:81-91. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.02.001>
- Meng, X. , Zhang, S. (2013) MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology* 51(1):245-266. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102314>
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9):405-410. doi:[https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02312-9)
- Mohammadi, M., Anoop, V., Gleddie, S. , Harris, L.J. (2011) Proteomic profiling of two maize inbreds during early gibberella ear rot infection. *Proteomics* 11(18):3675-3684. doi:<https://doi.org/10.1002/pmic.201100177>
- Montillet, J.-L., Chamnongpol, S., Rustérucci, C., Dat, J., van de Cotte, B., Agnel, J.-P., Battesti, C., Inzé, D., Van Breusegem, F. , Triantaphylidès, C. (2005) Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology* 138(3):1516-1526. doi:<https://doi.org/10.1104/pp.105.059907>
- Mubeen, S., Rafique, M., Munis, M.F.H. , Chaudhary, H.J. (2017) Study of southern corn leaf blight (SCLB) on maize genotypes and its effect on yield. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 16(3):210-217. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.06.006>

- Munns, R. (2011) Plant adaptations to salt and water stress: Differences and commonalities. *In: Advances in Botanical Research*. Turkan, I. (ed), Academic Press, vol 57, p. 1-32. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387692-8.00001-1>
- Munns, R. , Termaat, A. (1986) Whole-plant responses to salinity. *Functional Plant Biology* 13(1):143-160. doi:<https://doi.org/10.1071/PP9860143>
- Munns, R. , Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59(1):651-681. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Nanjo, Y., Skultety, L., Uvackova, L., Klubicova, K., Hajduch, M. , Komatsu, S. (2012) Mass spectrometry-based analysis of proteomic changes in the root tips of flooded soybean seedlings. *Journal of Proteome Research* 11(1):372-385. doi:<https://doi.org/10.1021/pr200701y>
- Narusaka, M., Shirasu, K., Noutoshi, Y., Kubo, Y., Shiraishi, T., Iwabuchi, M. , Narusaka, Y. (2009) RRS1 and RPS4 provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. *The Plant Journal* 60(2):218-226. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2009.03949.x>
- Nishimura, M.T., Stein, M., Hou, B.-H., Vogel, J.P., Edwards, H. , Somerville, S.C. (2003) Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* 301(5635):969-972. doi:<https://doi.org/10.1126/science.1086716>
- Pantalone, V., Kenworthy, W., Slaughter, L. , James, B. (1997) Chloride tolerance in soybean and perennial Glycine accessions. *Euphytica* 97(2):235-239. doi:<https://doi.org/10.1023/a:1003068800493>
- Paul, C., Naidoo, G., Forbes, A., Mikkilineni, V., White, D. , Rocheford, T. (2003) Quantitative trait loci for low aflatoxin production in two related maize populations. *Theoretical and Applied Genetics* 107(2):263-270. doi:<https://doi.org/10.1007/s00122-003-1241-0>
- Pechanova, O. , Pechan, T. (2015) Maize-pathogen interactions: an ongoing combat from a proteomics perspective. *International Journal of Molecular Sciences* 16(12):28429-28448. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms161226106>

- Pedersen, W.L. , Leath, S. (1988) Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. *Annual Review of Phytopathology* 26(1):369-378. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.py.26.090188.002101>
- Phang, T.-H., Shao, G. , Lam, H.-M. (2008) Salt Tolerance in Soybean. *Journal of Integrative Plant Biology* 50(10):1196-1212. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00760.x>
- Qadir, M., Quill rou, E., Nangia, V., Murtaza, G., Singh, M., Thomas, R.J., Drechsel, P. , Noble, A.D. (2014) Economics of salt-induced land degradation and restoration. *Natural Resources Forum* 38(4):282-295. doi:<https://doi.org/10.1111/1477-8947.12054>
- Qi, Y.-C., Wang, F.-F., Zhang, H. , Liu, W.-Q. (2010a) Overexpression of suadea salsa S-adenosylmethionine synthetase gene promotes salt tolerance in transgenic tobacco. *Acta Physiologiae Plantarum* 32(2):263-269. doi:<https://doi.org/10.1007/s11738-009-0403-3>
- Qi, Y.C., Liu, W.Q., Qiu, L.Y., Zhang, S.M., Ma, L. , Zhang, H. (2010b) Overexpression of glutathione S-transferase gene increases salt tolerance of Arabidopsis. *Russian Journal of Plant Physiology* 57(2):233-240. doi:<https://doi.org/10.1134/S102144371002010X>
- Qiu, P., Zhang, W., Li, C., Jiang, H., Liu, C., Fan, D., Zeng, Q., Hu, G. , Chen, Q. (2011) Genetic overlap of drought-tolerance loci between germination stage and seedling stage analyzed using introgression lines in soybean. *Acta Agronomica Sinica* 37:477-483. doi:<https://doi.org/10.3724/sp.j.1006.2011.00477>
- R Core Team (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. 3.5.0 edn, Vienna - Austria, p R Foundation for Statistical Computing
- Reid, L.M. , Altosaar, I. (2019) Host defense responses of CO441 and CL30 maize lines to *Fusarium graminearum* analyzed by comparative label-free quantitative proteomics. *bioRxiv*:700542. doi:<https://doi.org/10.1101/700542>
- Rolland, N., Curien, G., Finazzi, G., Kuntz, M., Maréchal, E., Matringe, M., Ravanel, S. , Seigneurin-Berny, D. (2012) The biosynthetic capacities of the plastids and integration between cytoplasmic and chloroplast processes. *Annual Review of*

- Genetics* 46:233-264. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132544>
- Roy, S.J., Negrão, S. , Tester, M. (2014) Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* 26:115-124. doi:<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.004>
- Rubio, M.C., Bustos-Sanmamed, P., Clemente, M.R. , Becana, M. (2009) Effects of salt stress on the expression of antioxidant genes and proteins in the model legume *Lotus japonicus*. *New Phytologist* 181(4):851-859. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02718.x>
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y. , Hunt, M.D. (1996) Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8(10):1809-1819. doi:<https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1809>
- Salekdeh, G.H. , Komatsu, S. (2007) Crop proteomics: Aim at sustainable agriculture of tomorrow. *Proteomics* 7(16):2976-2996. doi:<https://doi.org/10.1002/pmic.200700181>
- Santos, M.A., Freire, M.B.G.d.S., Almeida, B.G., Lins, C.M.T. , Silva, E.M. (2013) Dinâmica de íons em solo salino-sódico sob fitorremediação com *Atriplex nummularia* e aplicação de gesso. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 17(4):397-404. doi:<https://doi.org/10.1590/s1415-43662013000400007>
- Serrano, I., Audran, C. , Rivas, S. (2016) Chloroplasts at work during plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany* 67(13):3845-3854. doi:<https://doi.org/10.1093/jxb/erw088>
- Seyfferth, C. , Tsuda, K. (2014) Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science* 5:697-698. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00697>
- Shavrukov, Y. (2012) Salt stress or salt shock: which genes are we studying? *Journal of Experimental Botany* 64(1):119-127. doi:<https://doi.org/10.1093/jxb/ers316>

- Shinozaki, K. , Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997) Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiology* 115(2):327-334. doi:<https://doi.org/10.1104/pp.115.2.327>
- Slaymaker, D.H., Navarre, D.A., Clark, D., del Pozo, O., Martin, G.B. , Klessig, D.F. (2002) The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(18):11640-11645. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.182427699>
- Soda, N., Sharan, A., Gupta, B.K., Singla-Pareek, S.L. , Pareek, A. (2016) Evidence for nuclear interaction of a cytoskeleton protein (OsIFL) with metallothionein and its role in salinity stress tolerance. *Scientific Reports* 6:34762. doi:<https://doi.org/10.1038/srep34762>
- Storme, N. , Geelen, D. (2014) Callose homeostasis at plasmodesmata: molecular regulators and developmental relevance. *Frontiers in Plant Science* 5:138-139. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00138>
- Takahashi, D., Gorka, M., Erban, A., Graf, A., Kopka, J., Zuther, E. , Hinch, D.K. (2019) Both cold and sub-zero acclimation induce cell wall modification and changes in the extracellular proteome in *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports* 9(1):2289. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-019-38688-3>
- This, D., Comstock, J., Courtois, B., Xu, Y., Ahmadi, N., Vonhof, W.M., Fleet, C., Setter, T. , McCouch, S. (2010) Genetic analysis of water use efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) at the leaf level. *Rice* 3(1):72-86. doi:<https://doi.org/10.1007/s12284-010-9036-9>
- Van Loon, L.C., Rep, M. , Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44(1):135-162. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- Vandenborre, G., Smaghe, G. , Van Damme, E.J.M. (2011) Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry* 72(13):1538-1550. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.02.024>

- Vizcaino, J.A., Csordas, A., del-Toro, N., Dienes, J.A., Griss, J., Lavidas, I., Mayer, G., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ternent, T., Xu, Q.W., Wang, R., Hermjakob, H. (2016) Update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Research* 44(D1):D447-D456. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1145>
- Vizcaino, J.A., Deutsch, E.W., Wang, R., Csordas, A., Reisinger, F., Rios, D., Dienes, J.A., Sun, Z., Farrah, T., Bandeira, N., Binz, P.A., Xenarios, I., Eisenacher, M., Mayer, G., Gatto, L., Campos, A., Chalkley, R.J., Kraus, H.J., Albar, J.P., Martinez-Bartolome, S., Apweiler, R., Omenn, G.S., Martens, L., Jones, A.R., Hermjakob, H. (2014) ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nature Biotechnology* 32(3):223-226. doi:<https://doi.org/10.1038/nbt.2839>
- Vlot, A.C., Dempsey, D.M.A., Klessig, D.F. (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47(1):177-206. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
- Vogel, J., Somerville, S. (2000) Isolation and characterization of powdery mildew-resistant Arabidopsis mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(4):1897-1902. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.030531997>
- Vu, V.Q. (2011) ggbiplot: A ggplot2 based biplot., 0.55 edn
- Wang, C., Zien, C.A., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D.F., Wang, X. (2000) Involvement of Phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in Arabidopsis. *The Plant Cell* 12(11):2237-2246. doi:<https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2237>
- Wang, M., Rui, L., Yan, H., Shi, H., Zhao, W., Lin, J.E., Zhang, K., Blakeslee, J.J., Mackey, D., Tang, D., Wei, Z., Wang, G.-L. (2018) The major leaf ferredoxin Fd2 regulates plant innate immunity in Arabidopsis. *Molecular Plant Pathology* 19(6):1377-1390. doi:<https://doi.org/10.1111/mpp.12621>
- Wang, S., Chen, Z., Tian, L., Ding, Y., Zhang, J., Zhou, J., Liu, P., Chen, Y., Wu, L. (2019) Comparative proteomics combined with analyses of transgenic plants

- reveal ZmREM1.3 mediates maize resistance to southern corn rust. *Plant Biotechnology Journal* 17(11):2153-2168. doi:<https://doi.org/10.1111/pbi.13129>
- Wasternack, C. , Hause, B. (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* 111(6):1021-1058. doi:<https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
- Weidenbach, D., Esch, L., Möller, C., Hensel, G., Kumlehn, J., Höfle, C., Hüchelhoven, R. , Schaffrath, U. (2016) Polarized defense against fungal pathogens is mediated by the Jacalin-related lectin domain of modular Poaceae-specific proteins. *Molecular Plant* 9(4):514-527. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.009>
- Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N. , Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods* 6(5):359-362.
- Wolkers, W.F., McCready, S., Brandt, W.F., Lindsey, G.G. , Hoekstra, F.A. (2001) Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1544(1-2):196-206. doi:[https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00220-x](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00220-x)
- Wróblewski, T., Spiridon, L., Martin, E.C., Petrescu, A.-J., Cavanaugh, K., Truco, M.J., Xu, H., Gozdowski, D., Pawłowski, K., Michelmore, R.W. , Takken, F.L.W. (2018) Genome-wide functional analyses of plant coiled-coil NLR-type pathogen receptors reveal essential roles of their N-terminal domain in oligomerization, networking, and immunity. *PLoS Biology* 16(12):e2005821-e2005821. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005821>
- Wu, L., Chen, H., Curtis, C. , Fu, Z.Q. (2014) Go in for the kill: How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. *Virulence* 5(7):710-721. doi:<https://doi.org/10.4161/viru.29755>
- Xiang, Y., Song, M., Wei, Z., Tong, J., Zhang, L., Xiao, L., Ma, Z. , Wang, Y. (2011) A jacalin-related lectin-like gene in wheat is a component of the plant defence system. *Journal of Experimental Botany* 62(15):5471-5483. doi:<https://doi.org/10.1093/jxb/err226>

- Xu, J., Xing, X.-J., Tian, Y.-S., Peng, R.-H., Xue, Y., Zhao, W. , Yao, Q.-H. (2015) Transgenic Arabidopsis plants expressing tomato glutathione s-transferase showed enhanced resistance to salt and drought stress. *PLoS One* 10(9):e0136960. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136960>
- Yan-hua, Q., Wen-xiu, L., Zaib_un, N., Yang, Y., Xiao-xia, J., Li-jie, Y. , Chao, C. (2019) Identification and expression analysis of strigolactone biosynthetic and signaling genes in response to salt stress in soybean (*Glycine max*). *Preprints* 1000(41):1-15.
- Yan, J., Yuan, S.-s., Jiang, L.-l., Ye, X.-j., Ng, T.B. , Wu, Z.-j. (2015) Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(12):4961-4981. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6654-6>
- Yang, Z., Wang, C., Xue, Y., Liu, X., Chen, S., Song, C., Yang, Y. , Guo, Y. (2019) Calcium-activated 14-3-3 proteins as a molecular switch in salt stress tolerance. *Nature Communications* 10(1):1199. doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09181-2>
- Yarwood, C.E. (1970) Man-made plant diseases. *Science* 168(3928):218-220. doi:<https://doi.org/10.1126/science.168.3928.218>
- Yu, Y., Wang, A., Li, X., Kou, M., Wang, W., Chen, X., Xu, T., Zhu, M., Ma, D., Li, Z. , Sun, J. (2018) Melatonin-stimulated triacylglycerol breakdown and energy turnover under salinity stress contributes to the maintenance of plasma membrane H⁺-ATPase activity and K⁺/Na⁺ homeostasis in sweet potato. *Frontiers in Plant Science* 9(256)doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00256>
- Zeilinger, S., Gupta, V.K., Dahms, T.E.S., Silva, R.N., Singh, H.B., Upadhyay, R.S., Gomes, E.V., Tsui, C.K.-M. , Nayak, C.S. (2016) Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews* 40(2):182-207. doi:<http://doi.org/10.1093/femsre/fuv045>
- Zhang, Q., Lin, F., Mao, T., Nie, J., Yan, M., Yuan, M. , Zhang, W. (2012) Phosphatidic acid regulates microtubule organization by interacting with

MAP65-1 in response to salt stress in Arabidopsis. *The Plant Cell* 24(11):4555-4576. doi:www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.112.104182

Zhang, W.-J., Niu, Y., Bu, S.-H., Li, M., Feng, J.-Y., Zhang, J., Yang, S.-X., Odinga, M.M., Wei, S.-P., Liu, X.-F. , Zhang, Y.-M. (2014) Epistatic Association Mapping for Alkaline and Salinity Tolerance Traits in the Soybean Germination Stage. *PLoS One* 9(1):e84750. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084750>

Zhang, X.-C. , Gassmann, W. (2003) RPS4-mediated disease resistance requires the combined presence of RPS4 transcripts with full-length and truncated open reading frames. *The Plant Cell* 15(10):2333-2342. doi:<https://doi.org/10.1105/tpc.013474>

Zörb, C., Geilfus, C.M. , Dietz, K.J. (2019) Salinity and crop yield. *Plant Biology* 21(S1):31-38. doi:<https://doi.org/10.1111/plb.12884>